

**Neue Ansätze für biotechnologische Anwendungen der Mais *Ac/Ds*  
Transposonfamilie in heterologen Wirtspflanzen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Ralph Lisson

aus Lübeck

---

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Hehl

2. Referent: Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel

eingereicht am: 11.03.2009

mündliche Prüfung (Disputation) am: 21.08.2009

Druckjahr 2010

---

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Tagungsbeiträge**

Lisson R, Streitner C, Grosskopf D, Palme K, Hehl R.

Anwendung eines neuartigen Aktivierungstaggging-Systems für die Isolierung von Entwicklungsmutanten. Vortrag. 17. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen (2004)

Lisson R, Streitner C, Grosskopf-Kroiher D, Palme K, Hehl R.

Ein neuartiges Aktivierungstaggging-System für die Isolierung von Entwicklungsmutanten. Poster. Botanikertagung 2004, Braunschweig (2004)

Lisson R, Kraus J, Lehmann H, Hehl R.

Transposition of the maize *Ac/Ds*-elements in transgenic sugar beet. Poster. Plant Genetics Conference, Kiel (2006)

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>10</b>
1.1 Das Mais <i>Ac/Ds</i> -Transposonsystem.....	10
1.2 Anwendungen des modifizierten Mais <i>Ac/Ds</i> -Transposonsystems als molekulares Werkzeug.....	11
1.3 Systeme zur Markergeneliminierung bei Nutzpflanzen.....	12
1.4 Gensilencing durch <i>ihp</i> -Konstrukte.....	15
1.5 Ziele dieser Arbeit.....	16
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Enzyme.....	19
2.2 Lösungen.....	19
2.3 Medien.....	22
2.4 Kits.....	24
2.5 Spezielle technische Geräte.....	24
2.6 Bakterienstämme.....	25
2.7 Oligonukleotide.....	25
2.8 Plasmide.....	30
2.9 <i>In vitro</i> Konstrukte.....	30
2.9.1 <i>Ac/Ds</i> -Konstrukte, die bei Beginn der Arbeit vorhanden waren.....	30
2.9.2 <i>Ac/Ds</i> -Konstrukte zur stabilen Transformation in Zuckerrüben.....	32
2.9.3 Konstrukte zur Analyse der <i>Ac</i> -Transkriptmenge in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	33
2.9.4 Konstrukte für die Markergeneliminierung.....	34
2.9.5 Konstrukte für das Aktivierungstaging in Tabak.....	36
2.10 Pflanzenlinien.....	37
2.10.1 <i>Beta vulgaris hairy roots</i> .....	37
2.10.2 <i>Beta vulgaris</i> .....	38
2.10.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	38
2.10.4 <i>Nicotiana tabacum</i> .....	39

---

2.11 Transformation und Selektion von Zuckerrüben <i>hairy roots</i> .....	41
2.12 Transformation und Selektion von Zuckerrüben.....	42
2.13 Transformation von Tabak.....	43
2.14 Transformation, Selektion und Vermehrung von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	43
2.15 Samensterilisation und Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	44
2.16 Segregationsanalysen und Chi-Quadrat-Test.....	45
2.17 Screeningbedingungen.....	46
2.18 DNA-Extraktion aus Pflanzen.....	48
2.18.1 DNA-Extraktion aus Zuckerrüben <i>hairy roots</i> .....	48
2.18.2 DNA-Isolierung aus Blattmaterial von Zuckerrüben.....	48
2.18.3 DNA-Isolierung aus Blattmaterial von Tabakpflanzen.....	49
2.19 RNA-Isolierung aus Pflanzen.....	49
2.20 Reverse Transkription (RT-Reaktion).....	49
2.21 Agarosegel-Elektrophorese.....	49
2.22 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	50
2.23 Restriktionsspaltungen.....	50
2.24 Auffüllen von <i>sticky ends</i> .....	50
2.25 Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden.....	51
2.26 Ligation von Inserts und Vektoren.....	52
2.27 DNA-Fällung.....	52
2.28 Transformation mittels Hitzeschock.....	53
2.29 Herstellung kompetenter Zellen für die Hitzeschocktransformation.....	53
2.30 Elektrotransformation.....	53
2.31 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektrotransformation.....	54
2.32 Herstellung kompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen für die Elektrotransformation.....	55
2.33 Plasmidminipräparation.....	55
2.34 Plasmidmidipräparation.....	56
2.35 Plasmidmaxipräparation.....	56
2.36 Herstellung von Glycerindauerkulturen.....	57
2.37 Sequenzierungen und Auswertung.....	57
2.38 PCR ( <i>empty donor site</i> , <i>Ds</i> , <i>Ac</i> , <i>bar</i> ).....	57

2.39 Semiquantitative Multiplex-PCR.....	58
2.40 IPCR.....	59
2.41 Klonierung der PCR-Fragmente.....	61
2.42 GUS-Assay.....	62
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>63</b>
3.1 Untersuchungen zur Transposition von Mais <i>Ac/Ds</i> in der Zuckerrübe.....	63
3.1.1 Exzision von <i>Ac</i> und <i>Ds</i> in der Zuckerrübe.....	63
3.1.2 Sequenzveränderung an der Exzisionsstelle von <i>Ac</i> und <i>Ds</i> .....	66
3.1.3 Integrationsereignisse von <i>Ac</i> und <i>Ds</i> in der Zuckerrübe.....	68
3.2 Neue Konstrukte für die Markergeneliminierung.....	71
3.2.1 Reduzierung der TPase-Transkriptmenge durch <i>ihp</i> -Elemente in <i>A. thaliana</i> ...	71
3.2.2 Neue T-DNA Konstrukte für die optimierte Markergeneliminierung mit <i>ihp</i> -Elementen und Gateway-Technologie.....	74
3.2.3 Einklonierung von Zielgenen mittels Gateway-Technologie.....	76
3.3 Aktivierungstaggung in Tabak.....	78
3.3.1 LhG4 vermittelte Transkription .....	78
3.3.2 <i>Ac</i> vermittelte Transposition von <i>DspOp</i> in Tabak.....	81
3.3.3 Selektion (Etablierung) von Tabaklinien für das Aktivierungstaggung.....	84
3.3.4 Identifizierung phänotypisch auffälliger Tabakpflanzen.....	85
3.3.5 <i>DspOp</i> und LhG4 vermittelte Transkription.....	90
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>95</b>
4.1 Markergeneliminierung in transgenen Nutzpflanzen.....	95
4.1.1 Ein spezifischer Transpositionsmechanismus in der Zuckerrübe?.....	95
4.1.2 Die <i>Ac</i> -TPase wird <i>in planta</i> durch ein <i>ihp</i> -Element gesilenced.....	98
4.1.3 Die Anwendung des Mais- <i>Ac/Ds</i> Transposonsystems zur Herstellung markergenfreier Nutzpflanzen.....	99
4.2 Aktivierungstaggung in Tabak.....	101
4.2.1 Zusammenhang zwischen den neu entstandenen Transkripten mit den morphologischen Auffälligkeiten bei Tabakkeimlingen.....	101
4.2.2 Validierung verschiedener Methoden für das Phänotypenscreening von Tabakkeimlingen.....	103
4.2.3 Die Anwendung des Aktivierungstaggings mit <i>Ac/Ds</i> und LhG4 zur	

---

Identifizierung und Analyse neuer Gene.....	105
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>107</b>
<b>6 Literatur.....</b>	<b>109</b>
<b>7 Anhang.....</b>	<b>115</b>
7.1 Sequenzen.....	115
7.2 PCR-Nachweis von <i>Ac</i> , <i>Ds</i> und <i>donor site</i> in den Zuckerrübenlinien 001R und 002R.....	121
7.3 Segregationsanalysen der ADW/ADL-Tabaklinien.....	122
7.4 GUS-Werte.....	125
7.5 Segregationsanalysen der <i>A. thaliana</i> Linien mit <i>Ac</i> und <i>ihp</i> -Elementen.....	126
7.6 Gelfotos der Multiplex-RT-PCR zum <i>Ac</i> -Transkriptnachweis.....	130
7.7 DNA-, Glycerinkultur- und Samenverzeichnis.....	131

## Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
ABA	Abscisinsäure
Ac	<i>Activator</i>
Acc. No.	<i>Accession number</i>
ATP	Adenosintriphosphat
att	<i>attachment</i>
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV	<i>Cauliflower Mosaik Virus</i>
cDNA	komplementäre DNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
Ds	<i>Dissociation</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FLP	Flipase recombination enzyme
FRT	Flipase Recognition Target
<i>gapC</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	β-Glucuronidase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hyg	Hygromycin
IHF	<i>integration host factor</i>
ihp	<i>intron containing hairpin</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
KWS	Kleinwanzlebener Saatzucht
LB	Luria Broth
LhG4	Lac <sup>his</sup> Gal4



## Abkürzungsverzeichnis

---

<i>loxP</i>	<i>locus of X-ing over</i>
LUC	Luciferase
Met	Methotrexat
MS	Murashige-Skoog
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid
NAA	Naphthyl-1-essigsäure
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
pers.	persönliche
pH	potentia Hydrogenii
pOp	Promotor-Operator
Ppt	Phosphinothricin
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RISC	RNA <i>induced silencing complex</i>
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
SDS	Natrium-dodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
T-DNA	Transfer-DNA
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid

## 1 Einleitung

### 1.1 Das Mais *Ac/Ds*-Transposonsystem

Die Geschichte von Transposons geht zurück auf die Entdeckung von *Ac/Ds*-Transposonelementen in Mais durch Barbara McClintock vor mehr als 50 Jahren (Jones 2005). Die molekulare Analyse von *Ac/Ds* erfolgte in den 80er und 90er Jahren. Das *Ac*-Element gehört zu den Klasse II Transposons. Diese ist durch einen *cut-and-paste* Mechanismus gekennzeichnet, bei dem ein DNA Intermediat auftritt. Bei den Klasse I Transposons, den Retrotransposons, läuft die Transposition über einen *copy-and-paste* Mechanismus ab, wobei erst die Transkription in mRNA stattfindet, gefolgt von einer reversen Transkription und anschließender Integration (Bennetzen 2000).

Das *Ac*-(*Activator*)Element ist 4565bp groß und enthält einen kodierenden Bereich für die Transposase (TPase), das Enzym welches die Transposition vermittelt (Kunze und Weil 2002). Das Transkript aus dem *Ac*-Element ist ca. 3,5kb lang und enthält 5 Exons, welche die 807aa große TPase kodieren. Die N-terminalen 200aa enthalten Cluster von basischen Aminosäureresten, die das Kernlokalisierungssignal darstellen. Des Weiteren sind im Protein eine DNA-Bindungsdomäne und drei Dimerisierungsdomänen identifiziert worden (Kunze und Weil 2002).

*Ds*-(*Dissociation*)-Elemente sind in der Regel Deletionsderivate von *Ac*-Elementen, bei denen der interne Bereich, der für die TPase kodiert partiell oder vollständig fehlt. Somit können sie nicht autonom, jedoch durch *Ac*-TPase vermittelt transponieren. Beide Elemente besitzen die gleichen, für die Transposition essentiellen Enden, die im subterminalen Bereich diverse AACG-Bindungsmotive für die TPase tragen und von einer 11bp langen gespiegelten Sequenzwiederholung (*inverted repeats*) begrenzt sind. Bei der Transposition wird das Transposonelement an den *inverted repeats* ausgeschnitten. An der Exzisionsstelle kommt es durch die DNA-Reparaturmaschinerie zu einer Nukleotidveränderung, einem *footprint*. Dieser kann eine Deletion oder Insertion von einem oder mehreren Nukleotiden umfassen. Die Integration findet an einer beliebigen Stelle im Genom statt und ist durch eine 8bp Duplikation benachbart zum Transposon charakterisiert (Kunze und Weil 2002). Die Transposition kann auch während oder kurz nach der Replikation ablaufen. Wenn die *donor site* bereits repliziert ist und die Integration in eine noch nicht replizierte DNA-Region erfolgt, kommt es zur Erhöhung der Kopienzahl

der Transposonelemente (Chen *et al.* 1992). Andererseits kann auch eine Exzision ohne anschließende Integration der Elemente stattfinden. Die Transposonelemente wurden als lineare und zirkuläre DNA nachgewiesen, die ebenfalls ein postuliertes Intermediat beim Transpositionsvorgang darstellen (Gorbunova und Levy 2000).

Die Transposition der aus Mais stammenden *Ac/Ds*-Elemente konnte in vielen agronomisch relevanten Kulturpflanzen gezeigt werden, z.B. Reis (Shimamoto *et al.* 1993), Weizen (Takumi 1996), Gerste (Koprek *et al.* 2000) oder Kartoffel (Knapp *et al.* 1988), so dass die molekularbiologische Anwendung eines modifizierten *Ac/Ds*-Transposonsystems bei einem breiten Wirtsspektrum genutzt werden kann.

### **1.2 Anwendungen des modifizierten Mais *Ac/Ds*-Transposonsystems als molekulares Werkzeug**

Das Mais *Ac/Ds*-Transposonsystem bietet die Möglichkeit der Trennung von *Ac*-TPase und Transposonelement und kann deshalb als effizientes Werkzeug der Molekularbiologie umfunktioniert werden. Der Sequenzbereich innerhalb eines *Ds*-Elements kann beliebig gestaltet werden, da für die Transposition nur die Enden essentiell sind. Da die Transposition in einer Vielzahl von heterologen Wirtspflanzen abläuft, kann es fast universell eingesetzt werden. Daher bietet sich dieses System auch für die Erforschung von Nutzpflanzen an beziehungsweise für die Erzeugung von transgenen Nutzpflanzen (Qu *et al.* 2008).

Die ersten Anwendungen zielten darauf ab, neue Gene in Pflanzen zu isolieren und zu charakterisieren (Hehl 1994). Als einfachste Anwendung wird hier das Transposonsystem zur Insertionsmutagenese eingesetzt. Da die Transposition von *Ds*-Elementen aus einer *donor site* in viele verschiedene Positionen des Genoms erfolgt, ist man nur auf wenige Primärtransformanten angewiesen. Dieser Vorteil gegenüber der Insertionsmutagenese mit T-DNA ist bei schwer transformierbaren Pflanzen, zu denen die meisten Nutzpflanzen gehören, ausschlaggebend (Qu *et al.* 2008). Bei der Insertionsmutagenese werden die betroffenen Gene ausgeschaltet. Dies kann zu einem veränderten Phänotyp führen und einen Hinweis auf die Rolle des entsprechenden Gens in der Pflanze liefern. Die Isolierung dieser Gene für eine weitere Charakterisierung ist durch den Transposon-*tag* möglich. Beim Reis wurden zum Beispiel mit der *Ds*-Insertionsmutagenese Pflanzen mit erhöhter Samenausbeute generiert, sowie Pflanzen mit veränderter Salz- und

Trockenstresstoleranz und die dafür verantwortlichen Gene isoliert (Jiang *et al.* 2007, Kolesnik *et al.* 2004).

Eine weitere Möglichkeit *Ac/Ds* für die Funktionsanalyse von Genen zu nutzen, ist das sogenannte *promoter trapping*, dessen Anwendung von Meissner *et al.* 2000 in der Tomate untersucht wurde. Hierbei wurde das *Ds*-Element mit einem promotorlosen Reportergen (*luc*) versehen und durch *Ac* zur Transposition gebracht. Nach Integration von *Ds* in transkribierte Bereiche, verläuft die beobachtete Reportergenaktivität parallel zur entsprechenden Promotoraktivität des betroffenen Gens. Der nicht invasive und nicht destruktive Reporter ermöglicht die Echtzeit-Verfolgung der Promotoraktivität sowie die Aufklärung der Gewebespezifität *in planta* (Meissner *et al.* 2000).

Mit dem Ansatz der Insertionsmutagenese bleiben allerdings noch viele Gene unentdeckt, zum Beispiel solche, die zu einer Genfamilie gehören und deren knock-out durch andere Mitglieder dieser Familie kompensiert werden kann. Das gleiche Problem entsteht bei Insertionsmutagenese in polyploiden Pflanzen wie zum Beispiel Tabak, Baumwolle, Weizen, Hafer, Kartoffel (Adams und Wendel 2005). Auch hier wird der knock-out eines Allels seltener eine Auswirkung haben. Andererseits kann eine Insertion auch letale Auswirkungen haben, so dass die entsprechenden Gene nicht mit dieser Methode getaggt werden können. Solche und weitere Genfunktionen können effektiver über Aktivierungstaggung-Systeme analysiert werden. Hierbei geben die entstehenden dominanten Phänotypen Hinweise, wie sich eine Überexpression der Zielgene oder Teile davon auswirkt (Pereira 2000). Die benötigten Aktivatorelemente, zum Beispiel CaMV35S-Enhancer oder ein starker, konstitutiver Ubiquitin-Promotor können zwischen die *Ds*-Enden eingefügt werden und zum Aktivierungstaggung verwendet werden. Dies wurde zum Beispiel bei Reis und Gerste erfolgreich getestet (Suzuki *et al.* 2001, Ayliffe 2007).

### 1.3 Systeme zur Markergeneliminierung bei Nutzpflanzen

In der modernen Pflanzenzüchtung werden immer häufiger molekularbiologische Methoden eingesetzt. Transgene Pflanzen können in Eigenschaften verbessert werden, die mit herkömmlichen Züchtungsverfahren nicht zu erreichen sind oder nur mit einem erheblich größerem Zeitaufwand. Bei der Verbesserung der Sorten stehen die Vermittlung von Resistenzen gegenüber Schädlingsbefall, Toleranz gegenüber abiotischen Stress und Erhöhung des Ertragsausbeute im Vordergrund (Shewry *et al.* 2008). Um transgene

Pflanzen zu erzeugen, wird das Zielgen in die Pflanzenzellen eingeschleust, aus denen dann über Gewebekultur vollständig entwickelte Pflanzen regeneriert werden können. Die häufigsten und am besten etablierten Methoden für die Pflanzentransformation sind die Agrobakterien vermittelte Übertragung von T-DNA und der direkte Transfer durch biolistische Methoden oder Mikroinjektion (Tzfira und Citovsky 2006). Bei allen Methoden wird nur ein geringer Prozentsatz an Zellen transformiert, der dann durch Selektion bei der Regeneration von den nicht transformierten Zellen unterschieden werden muss. Dafür ist die Kopplung des Zielgens an ein Markergen notwendig. Als Markergene in der Nutzpflanzenzüchtung kommen neben Detektionsmarkern wie GUS oder GFP am häufigsten Antibiotika- bzw. Herbizidresistenzgene zum Einsatz (Miki und McHugh 2004). Die Verwendung von Antibiotika- und Herbizidresistenzgenen als Marker ist mit einem gewissen Risiko verbunden. Es besteht theoretisch die Möglichkeit, dass Antibiotika-Resistenzen durch horizontalen Gentransfer zum Beispiel in Darmbakterien von Tieren gelangen und damit in die Nahrungskette. Weiterhin besteht die Gefahr, dass ein vertikaler Transfer durch Auskreuzung mit Wildpflanzen zur Verbreitung von Herbizid-Resistenzen führt. Die Folgen dieser Ausbreitungsmöglichkeiten der Markergene auf die Umwelt sind nur schwer abzuschätzen. Dies ist unter anderem ein Grund, der dazu führt, dass die Freisetzung von transgenen Pflanzen in der Bevölkerung als kritisch angesehen wird (Puchta 2003). Die Ablehnung von Produkten aus transgenen Pflanzen führt bei den Landwirten zur eingeschränkten Nutzung von transgenen Sorten, trotz der Vorteile im Anbau und eventuell niedrigerer Kosten. Neben der Bevölkerungsakzeptanz sind auch die Genehmigungsverfahren der Zulassungsbehörden für Pflanzen mit Markergenen erschwert, da auch diese Fremdgene in den Pflanzen genau charakterisiert werden müssen, um Gefahren für Mensch und Umwelt abzuwiegen (GenTG/BGB1 2008). In Ländern der Europäischen Union dürfen ab 2009 keine Pflanzen mehr freigesetzt werden, die Markergene tragen, welche Resistenz gegen in der human- oder tierärztlichen Behandlung verwendete Antibiotika vermitteln (GenTG/BGB1 2008). Als Konsequenz müssen die Züchtungsfirmen versuchen, transgene Pflanzen ohne Markergene zu erzeugen.

Neben diesen Aspekten der biologischen Sicherheit gibt es auch praktische Vorteile beim Herstellungsprozess transgener Pflanzen, die eine Vermeidung von Markergenen sinnvoll machen. Zunächst ist die Bandbreite der zur Verfügung stehenden Marker bei einigen Kulturpflanzen stark begrenzt und der Einsatz eines neuen Markers geht einher mit aufwendigen Etablierungsverfahren. Davon ausgehend, dass die bestehenden transgenen

Pflanzen mit Markergenen später noch weitere Male durch Einbringen neuer Gene verbessert werden sollen, müssten jedes Mal andere Marker benutzt werden und es käme zur Anhäufung der Markergene mit Steigerung aller oben angedeuteten Probleme. Bei Verwendung von Markergenen könnten auch pleiotrope Effekte durch die zusätzlichen Genprodukte auftreten, die eine aufwendige Analyse zu Folge hätten (Filipecki und Malepszy 2006).

Konzepte zur Markergeneeliminierung, die aktuell häufig in der Nutzpflanzenzüchtung eingesetzt werden, sind Kotransformation, Site-spezifische Rekombination und Transposition (Puchta 2003). Bei der Kotransformation werden Zielgen und Markergen auf zwei getrennten T-DNAs integriert. Für die Pflanzentransformation bieten sich jetzt mehrere Kombinationen an. Es kann ein Gemisch von zwei Bakterienstämmen mit jeweils einem T-DNA Vektor verwendet werden. Alternativ kann ein Bakterienstamm mit zwei Vektoren oder auch ein Vektor mit zwei T-DNA Bereichen benutzt werden (Huang 2004). Die Integration beider T-DNAs erfolgt im Pflanzengenom an unabhängigen Positionen. Die Selektion und anschließende Regeneration der transformierten Zellen erfolgt dann mittels Selektionsmarker. Bei Integration der beiden T-DNAs an nicht gekoppelte Loci, kann in der nächsten Pflanzengeneration das Markergen ausgekreuzt werden und man erhält Pflanzen, die nur noch die T-DNA mit dem Zielgen enthalten. Von den zur Zeit zugelassenen gentechnisch veränderten Pflanzen wurde zwar keine mit dieser Methode hergestellt, jedoch ist die effiziente Anwendbarkeit der Kotransformation für Reis- und Maispflanzen demonstriert worden (Breitler *et al.* 2003, Miller *et al.* 2002).

Die zweite Möglichkeit Markergene zu eliminieren, ist der Einsatz von Rekombinationssystemen. Die prominentesten sind Cre/*loxP* (Bacteriophage P1), FLP/FRT (*Saccharomyces cerevisiae*) und R/RS (*Zygosaccharomyces rouxii*). Der Aufbau und das Wirkungsprinzip ist bei allen ähnlich. Die Rekombinasen (Cre, FLP, R) vermitteln die Rekombination von jeweils zwei konservierten Rekombinationssites (*loxP*, FRT, RS) mit einer Länge von 31-34 Nukleotiden (Hare und Chua 2002). Für die Markergeneeliminierung wird das Markergen von zwei Rekombinationssites flankiert. Die Rekombinase schneidet den Bereich zwischen den *sites* heraus, der in der Zelle zirkularisiert und degradiert wird. Auf der T-DNA mit dem Zielgen bleibt eine Rekombinationssite zurück. Die erste für den Anbau zugelassene transgene markergenfreie Pflanze, die mit dem Cre/*loxP* System generiert wurde, ist die Futtermaissorte LY038, die durch das Gen *cordapA* einen erhöhten Lysingehalt besitzt. (Ow 2007, AGBIOS Datenbank: <http://www.agbios.com>).

Ein weiteres alternatives Konzept für die Markergeneliminierung ist die Verwendung von Transposons, wobei die Untersuchungen für das Mais-Ac/Ds-System in Bezug auf die Anwendung bei Nutzpflanzen am weitesten fortgeschritten ist. Das Prinzip ist schon 1993 von Goldsbrough *et al.* beschrieben worden. Ähnlich wie bei Rekombinationssystemen wird auch hier im einfachsten Fall das Markergen oder das Zielgen von Ds-Enden flankiert und die Ac-Transposase vermittelt die Translokation des Elements. Bei Integration an einem nicht mit der *donor site* gekoppelten Locus kann in der Nachfolgegeneration die Segregation von Zielgen und Markergen erfolgen. Cotsaftis *et al.* (2002) haben mit Hilfe des Ac/Ds-Systems markergenfreie und T-DNA freie Reispflanzen erzeugt, die nur ein *cry1B* Gen flankiert von zwei Transposonenden tragen, welches das Bt-Endotoxin exprimiert, dass gegen Insektenfraß wirkt. Die Ac-Transposase für die Transposition des Ds-Zielgenkonstrukts wurde hierfür konstitutiv von derselben T-DNA exprimiert, die auch das Ds-Zielgenkonstrukt und ein Markergen trug. Es wurden in den positiv transformierten Pflanzen multiple somatische Insertionen beobachtet, so dass eine etablierte Linie mit einem einzelnen stabilen Ds-Zielgen Insertionsereignis, das unabhängig von der T-DNA segregiert hat, erst in der 2. Nachfolgegeneration vorlag (Cotsaftis *et al.* 2002).

### 1.4 Gensilencing durch ihp-Konstrukte

Bei der konstitutiven starken Expression der Ac-Transposase, kann es zu einer erhöhten Transpositionsfrequenz kommen, wodurch Sekundärtranspositionen auftreten. Jede Exzision hinterlässt allerdings einen *footprint* (s.o.), der in der Pflanze eine Mutation hervorrufen kann. Bisher wurde noch kein System experimentell untersucht, das die Vermeidung von Sekundärtranspositionen beinhaltet. Das in dieser Arbeit beschriebene System zur Markergeneliminierung sieht vor, die Transposase-Aktivität durch einen RNAi-Mechanismus nach der Primärtransposition des Ds-Zielgens zu unterbinden.

RNA Interferenz (RNAi) bezeichnet das Phänomen des post-transkriptionellen Gensilencing, induziert durch doppelsträngige RNA. Dieses Prinzip, das ursprünglich im Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurde (Fire 1999), ist inzwischen als konservierter Mechanismus in Pflanzen, Pilzen und Tieren erkannt worden (Susi *et al.* 2004). Die doppelsträngige RNA wird durch DICER, eine zur RNaseIII-Familie gehörende dsRNA-spezifische Nuklease, in kleine 21-24bp lange Fragmente zerlegt. Ein Strang dieser siRNA wird in den RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex) eingebaut und

eine komplementäre mRNA wird durch Nukleasen des RISC-Komplexes degradiert (Kusaba 2004).

In der Molekularbiologie wird das RNA-Silencing seit einiger Zeit als Werkzeug eingesetzt, um Gene gezielt auszuschalten beziehungsweise herunter zu regulieren. Eine besonders effektive Reprimierung der Genexpression erreicht man durch ihp-Konstrukte (*intron-containing hairpin*). Sie enthalten die Zielsequenz in *sense* und *antisense* Orientierung, getrennt durch ein funktionelles Intron (Smith *et al.* 2000). Die transkribierte ihp-mRNA formt eine Haarnadelstruktur, bestehend aus einem komplementären *sense* und *antisense* Abschnitt, aus der das Intron als Schlaufe hervorsteht und herausgespleißt wird. Dadurch entsteht doppelsträngige RNA, die von DICER in siRNA zerlegt wird. Die Ursache, warum das Silencing mit ihp-Konstrukten sehr effizient funktioniert, ist noch nicht geklärt, jedoch wird vermutet, dass beim Spleißen des Introns der *sense* und *antisense*-Arm in räumliche Nähe gebracht werden, was die Bildung von dsRNA begünstigt (Wesley *et al.* 2001).

### 1.5 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll das *Ac/Ds*-Transposonsystem für neue beziehungsweise erweiterte biotechnologische Anwendungen in Pflanzen erschlossen werden. Zum einen wurde für die Gencharakterisierung ein neues Aktivierungstaggung-System entwickelt, bei dem das *Ac/Ds*-Transposonsystem mit einem regulierbaren Transkriptionsaktivator kombiniert wird. Zum anderen soll das *Ac/Ds*-System zur Markergeneliminierung in transgenen Nutzpflanzen eingesetzt werden.

Für das regulierbare Aktivierungstaggung-System ist das pOp/LhG4 Transkriptions-Aktivierungssystem mit einbezogen worden (Moore *et al.* 1998). Das pOp-Element (promoter Operator) besteht aus zwei Kopien einer Operatorsequenz des *lac*-Operons aus *E. coli* und einem minimalen CaMV35S-Promotor (Bereich +8 bis -50 relativ zum Transkriptionsstart). Beim Transkriptionsaktivator LhG4 (Lac<sup>his</sup> Gal4II) handelt es sich um eine Fusion der Transkriptionsaktivierungsdomäne II von Gal4 aus *Saccharomyces cerevisiae* mit der modifizierten DNA-Bindungsdomäne des *lacI*-Repressors aus *E. coli*. Der Austausch von Tyrosin 17 gegen Histidin in der *lacI*-Repressormutante führt zu einer hundertfach höheren Affinität zur *lac*-Operatorsequenz im Vergleich zum Wildtyp (Lehming *et al.* 1987). Die pOp-Region ist zwischen den *Ds*-Enden lokalisiert und bei Anwesenheit von LhG4 soll die Transkription aus dem *Ds* heraus initiiert werden. Das System soll



chemisch durch IPTG regulierbar sein. Bei Anwesenheit von IPTG, welches an den *lac*-Repressor bindet, verliert LhG4 seine Affinität zur Operatorsequenz und die Transkription wird unterbunden. Damit bietet sich die Möglichkeit die Funktionsanalyse der getaggtten Gene zu erweitern. Zum Beispiel können die Pflanzen unter Zugabe von IPTG normal heranwachsen und die Genexpression kann erst ab einem bestimmten Entwicklungsstadium aktiviert werden. In dieser Arbeit soll bei Tabak als tetraploide Modellpflanze gezeigt werden, dass *in planta* die Genexpression aus dem *DspOp*-Element heraus durch den Transkriptionsaktivator LhG4 funktioniert. Des Weiteren soll ermittelt werden, ob sich die Expression durch IPTG herunter regulieren lässt. Es soll untersucht werden, ob in einer Pflanzenpopulation, die transponierte *DspOp* Elemente und den Transkriptionsaktivator LhG4 enthält, phänotypische Veränderungen durch das Aktivierungstaggung entstehen, welche Screening-Methode sich eignet, um diese aufzuspüren und ob Transkripte isoliert werden können, die in Zusammenhang mit der Veränderung gebracht werden können.

Eine zweite Anwendung zur Nutzung von *Ac/Ds*-Transposons ist die Markergeneliminierung. Hier soll ein innovatives Vektorsystem entwickelt werden, das alle Komponenten für den Einsatz zur Markergeneliminierung bei transgenen Nutzpflanzen enthält, wobei auch neue Komponenten mit einbezogen werden. Das System sieht vor, die Transposaseaktivität zu regulieren, um Sekundärtranspositionen zu unterbinden. Hier soll untersucht werden, ob ein Silencen der Transposase durch ein *ihp*-Konstrukt funktioniert. Diese Funktionalität soll zunächst *in planta* an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden. Im vorgesehenen T-DNA Vektorkonstrukt, das alle Komponenten für die Markergeneliminierung enthält, ist die Anwendung der Gateway®-Technologie für das Einbringen von Zielgenen vorgesehen (URL: <http://www.invitrogen.com/gateway.html>). Die Gateway-Technologie ermöglicht durch eine *in vitro* Rekombination das schnelle und effiziente Einklonieren von Genen in einen entsprechend vorbereiteten Vektor. Hierbei werden modifizierte *attachment sites* (*att*) des Bakteriophagen Lambda genutzt (Hartley *et al.* 2000). Das Zielgen liegt in einen sogenannten pENTR Vektor vor, in dem es von zwei *attL sites* flankiert ist. Der Zielvektor pDEST enthält eine Gateway-Kassette, die von zwei *attR sites* begrenzt ist und als negativen Selektionsmarker ein *ccdB*-Gen enthält. Das *ccdB*-Gen kodiert für einen DNA-Gyrase Inhibitor und wirkt letal auf das Bakterienwachstum. In einem *in vitro* Reaktionsansatz, in dem die Vektoren pENTR und pDEST sowie ein Clonase-Mix, bestehend aus Puffer, dem Clonase Enzym und IHF (*integration host factor*), enthalten sind, findet durch die Rekombination der *att sites* ein

Austausch von Gateway-Kassette und Zielgen statt. Dieser Ansatz wird in *E. coli* transformiert. Die Selektion auf pDEST tragende Klone erfolgt über einen Antibiotika-Selektionsmarker auf diesem Plasmid. Der negative Selektionsmarker *ccdB* verhindert das Wachstum der nicht rekombinanten Klone, die noch die Gateway-Kassette tragen. Das Gateway-System stellt hier eine zeitsparende und effiziente Alternative zum Klonieren via Restriktionsspaltung und Ligation dar. Darüber hinaus ist es als Ausgangsbasis für eine umfassende Gencharakterisierung geeignet, da die unkomplizierte, schnelle Übertragung in andere etablierte und in Datenbanken zugänglichen Gateway-Vektorsysteme ermöglicht wird, ohne dass individuelle Klonierungsstrategien ausgearbeitet werden müssen. Dies können zum Beispiel Bakterien-Überexpressionsvektoren, Hefe Two-Hybrid Vektoren, Pflanzen-Expressionsvektoren oder Vektoren, die eine C-terminale Fusion mit GUS, GFP oder Aufreinigungs-*tags* ermöglichen sein (URL: <http://www.invitrogen.com/gateway.html>).

Für eine mögliche Anwendung des neuen *Ac/Ds*-Systems zur Markergeneliminierung kommt die Zuckerrübe in Frage. Da bisher noch keine Daten zur Transposition von *Ac/Ds* in der Zuckerrübe publiziert wurden, sollte hier untersucht werden, ob die Transposition in der Zuckerrübe prinzipiell funktioniert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Enzyme

Im Zuge dieser Arbeit wurden Chemikalien und Verbrauchsmaterialien der Firmen Applichem, BD Bioscience, BioRad, Carl Roth GmbH, Duchefa Biochemie BV, Life Technologies, Merck Eurolab GmbH, Serva Electrophoresis GmbH und Sigma-Aldrich Chemie GmbH verwendet. Restriktionsenzyme und DNA modifizierende Enzyme wurden von den Firmen BD Bioscience, Bioline, Boehringer, Invitrogen, MBI Fermentas, New England Biolabs, OLS OMNI Life Science GmbH&Co KG, Qbiogene und Stratagene bezogen.

### 2.2 Lösungen

- Bradford-Lösung: Bradford-Reagenz Roti<sup>®</sup>-Quant (Carl Roth GmbH), 1:5 mit Wasser verdünnt
- 2x CTAB DNA-Extraktionspuffer:
  - 20ml 1M Tris-HCl, pH 8
  - 8ml 0,5M EDTA, pH 8
  - 2g CTAB
  - 56ml 5M NaCl
  - 20ml PVP-10, 10%ig
  - 96ml dH<sub>2</sub>OGesamtvolumen: 200ml +10µl/ml 2-Mercaptoethanol, frisch dazugeben
- Denaturierungslösung für Plasmidminipräparation (Alkalische Lyse):
  - 0,2M NaOH
  - 1% SDS
- DNA Loading Dye (6x); MBI Fermentas, Kat# R0611
- dNTP-Mix (10mM = 2,5nmol/µl je):
  - je 30µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100nmol/µl)
  - 1080µl dH<sub>2</sub>O

- Ethidiumbromid-Lösung, 1% (10mg/ml); Carl Roth GmbH
- Glucoselösung, 2M; 80,12g in 50ml dH<sub>2</sub>O
- GUS-Reaktionspuffer: Proteinextraktionspuffer + 1mM 4-MUG
- HEPES-Puffer:
  - 238mg HEPES
  - ad 1000ml dH<sub>2</sub>O, pH 7
- KCl Lösung, 1M; 7,46g in 100ml dH<sub>2</sub>O
- 10x Ladepuffer:
  - 25mg Bromphenolblau (0,25%)
  - 25mg Xylencyanol
  - 2,5g Ficoll-400
  - ad 10ml dH<sub>2</sub>O
- LTE-Puffer:
  - 10mM Tris-HCl, pH 7,5
  - 0,1mM EDTA
- MgCl<sub>2</sub> Lösung, 1M; 9,52g in 100ml dH<sub>2</sub>O
- MgSO<sub>4</sub> Lösung, 1M; 12,04g in 100ml dH<sub>2</sub>O
- Na-Acetat Lösung, 3M; 24,61g in 100ml dH<sub>2</sub>O
- NaCl Lösung, 4M; 23,38g in 100ml dH<sub>2</sub>O
- NH<sub>4</sub>-Acetat Lösung, 4M; 3,08g in 10ml dH<sub>2</sub>O
- PEG4000 Lösung, 50%ig; MBI Fermentas
- Proteinextraktionspuffer:
  - 50mM NaPO<sub>4</sub>, pH7
  - 10mM Na<sub>2</sub>EDTA
  - 0,1% Triton X-100
  - 0,1% Sarcosyl (N-Laurylsarcosin)
  - 10mM β-Mercaptoethanol

- Renaturierungslösung für Plasmidminipräparation (Alkalische Lyse):
  - 3M Kaliumacetat, pH4,8
- Sterilisationslösung:
  - 21,9ml Na-hypochlorid, 12%ig
  - 78,1ml H<sub>2</sub>O
  - 100µl Triton X-100
- 50x TAE-Elektrophoresepuffer:
  - 242g Tris
  - 57,1ml konzentrierte Essigsäure
  - 100ml 0,5M EDTA, pH 8,0
  - ad 1000ml dH<sub>2</sub>O
- TFB I-Puffer:
  - 30mM Kaliumacetat
  - 50mM MnCl<sub>2</sub>
  - 100mM RbCl
  - 10mM CaCl<sub>2</sub>
  - 15% (w/v) Glycerin
  - pH 5,8 (mit Essigsäure einstellen)
- TFB II-Puffer:
  - 10mM MOPS-Natriumsalz
  - 10mM RbCl
  - 75mM CaCl<sub>2</sub>
  - 15% (w/v) Glycerin
  - pH 7 (mit Essigsäure einstellen)
- Zellsuspensionspuffer für Plasmidminipräparation (Alkalische Lyse):
  - 50mM Glucose
  - 10mM EDTA
  - 25mM Tris-HCl, pH8,0

### 2.3 Medien

- $\frac{1}{2}$ B5-Medium:
  - 75mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
  - 1250mg  $\text{KNO}_3$
  - 125mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
  - 75mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
  - 67mg  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
  - 1,5mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$
  - 0,375mg KI
  - 1mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
  - 5mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
  - 0,0125mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
  - 0,125mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
  - 18,35mg FeNa-EDTA
  - 50mg Myo-Inositol
  - 0,5mg Nicotinsäure
  - 0,5mg Pyridoxine HCl
  - 5mg Thiamine HCl
  - 40g Glucose
  - ad 1000ml  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 6

Festes  $\frac{1}{2}$ B5-Medium für Platten enthält zusätzlich 8g/l Agar.
- $\frac{1}{2}$ B5/C/T-Medium:  $\frac{1}{2}$ B5-Medium + 350mg/l Carbenicillin + 500mg/l Timentin
- DYT-Medium:
  - 16g Bacto-Trypton
  - 10g Hefe-Extrakt
  - 5g NaCl
  - ad 1000ml d $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,0
- LB-Medium:
  - 10g Bacto-Trypton
  - 5g Hefe-Extrakt
  - 2,4g  $\text{MgSO}_4$  (=10ml 1M  $\text{MgSO}_4$ -Lösung)
  - 10g NaCl
  - ad 1000ml  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,0

Festes LB-Medium für Platten enthält zusätzlich 15g/l Agar.

- LB/Carb-Medium: LB-Medium + 100mg/l Carbenicillin
- LB/Carb/Rif-Medium: LB-Medium + 50mg/l Rifampicin
- LB/Carb/X-Gal-Medium: LB-Medium + 100mg/l Carbenicillin + 50mg/l X-Gal
- LB/R/C/K-Medium: LB-Medium + 50mg/l Rifampicin + 100mg/l Carbenicillin + 100mg/l Kanamycin
- MS-Medium:
  - 4,9g Murashige-Skoog
  - 10g Saccharose
  - ad 1000ml H<sub>2</sub>O, pH 5,9-6,0

Festes MS-Medium für Platten bzw. Pflanzboxen enthält zusätzlich 8g/l Agar.

- ½MS-Medium: wie MS, jedoch die halbe Menge Murashige-Skoog
- MS/BAP-Medium: MS-Medium + 0,25mg/l BAP
- MS/BAP/C/T-Medium: MS-Medium + 0,25mg/l BAP + 350mg/l Carbenicillin + 100mg/l Timentin
- MS/C-Medium: MS-Medium + 0,5mg/l BAP + 0,2mg/l NAA + 250mg/l Cefotaxim
- MS/Phos-Medium: MS-Medium + 10mg/l Phosphinothricin
- MS/S-Medium: MS-Medium + 2mg/l BAP + 0,1mg/l NAA + 250mg/l Cefotaxim
- MS/W-Medium: MS-Medium + 250mg/l Cefotaxim
- SOB-Medium:
  - 20g Bacto-Trypton
  - 5g Hefe-Extrakt
  - 10mM NaCl (=2,5ml 4M NaCl-Lösung)
  - 2,5mM KCl (=2,5ml 1M KCl-Lösung)
  - 10mM MgCl<sub>2</sub> (=10ml 1M MgCl<sub>2</sub>-Lösung)
  - 10mM MgSO<sub>4</sub> (=10ml 1M MgSO<sub>4</sub>-Lösung)
  - ad 1000ml dH<sub>2</sub>O, pH 6,8-7
- SOC-Medium:
  - 10ml 2M Glucoselösung
  - ad 1000ml SOB-Medium

### 2.4 Kits

- DNeasy Plant Mini Kit; Qiagen GmbH, Kat.# 69104
- Gateway<sup>®</sup>Vector Conversion System; Invitrogen, Kat.# 11828
- Nucleobond AX Kit; Macherey&Nagel GmbH&Co KG, Kat.# 740521
- NucleoSpin<sup>®</sup>Extract Kit; Macherey&Nagel GmbH&Co KG, Kat.# 740590
- NucleoSpin<sup>®</sup>Plant II; Macherey&Nagel GmbH&Co KG, Kat.# 740770
- NucleoSpin<sup>®</sup>RNA Plant; Macherey&Nagel GmbH&Co KG, Kat.# 740949
- QIAquick Nucleotide Removal Kit; Qiagen GmbH, Kat.# 28304
- QIAQuick<sup>®</sup>Nucleotide Removal Kit; Qiagen GmbH, Kat.# 28304
- REDExtract-N-Amp<sup>™</sup>Plant PCR Kit; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Kat.# XNA-P
- RevertAid<sup>™</sup>First Strand cDNA Synthesis Kit; MBI Fermentas, Kat.# K1622
- TA Cloning<sup>®</sup>Kit; Invitrogen, Kat.# K2000

### 2.5 Spezielle technische Geräte

- Elektroporationsgerät: GenePulser II, Bio-Rad Laboratories GmbH
- Fluorescence Spectrometer: LS 30, PerkinElmer Life and Analytical Sciences
- Großzentrifuge: Sorvall RC-5B, Du Pont Instruments
- Lichtschrank: CU-32L, Percival Scientific
- PCR-Thermocycler: Mastercycler, Eppendorf AG
- Tischzentrifugen: Heraeus Instruments GmbH
- Untertischzentrifuge: GS-6KR, Beckman Coulter GmbH



## 2.6 Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung/Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
ccdB Survival	<i>Escherichia coli</i> <i>F' mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG tonA::P<sub>trc</sub>-ccdA</i>	Invitrogen
InvaF'	<i>Escherichia coli</i> <i>F' endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1gyrA96 relA1φ80 lacZΔ M15Δ (lacZYA- argF) U169 λ</i>	Invitrogen
XL1blue MRF	<i>Escherichia coli</i> <i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac F' [ proAB+ lacI<sup>q</sup> lacZΔ M15 Tn 10(tetr)]</i>	Stratagene
C58C1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> pGV2260	van Deblaere <i>et al.</i> 1985
Ri15834	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Kraus (KWS/Planta GmbH), pers. Mitteilung

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme

## 2.7 Oligonukleotide

Alle bei der Firma Invitrogen oder MWG-Biotech bestellten Oligonukleotide wurden als 100pmol/μl Stammlösung mit LTE angesetzt. Für die PCR wurde die Stammlösung jeweils 1:5 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. Nachfolgend sind die Primerpaare für das jeweils nachzuweisende Fragment aufgelistet.

Fragmente von *Ac* und *Ds* für die Herstellung der Vektorkonstrukte:

- Primer Ac1685(XbaI): Oligonukleotid, 29-mer;

5'-GCCTCTAGACCTCTTCTAGTCGGATTCAG-3'

- Primer Ac1685(XhoI): Oligonukleotid, 29-mer;

5'-GTTCTCGAGCCTCTTCTAGTCGGATTCAG-3'

- Primer Ac1742(XbaI): Oligonukleotid, 28-mer;

5'-GCGTCTAGAGCACATCACCATCATCATC-3'

- Primer Ac1742(XhoI): Oligonukleotid, 28-mer;

5'-CTACTCGAGGCACATCACCATCATCATC-3'

- Primer Ac1954<(EcoRI): Oligonukleotid, 28-mer;

5'-CCGGAATTCACCTTCTTTGCCCTCTTCTG-3';

- Primer Ac1954<(HindIII): Oligonukleotid, 28-mer;

5'-CCGAAGCTTACTTCTTTGCCCTCTTCTG-3';

- Primer Ac2085<(EcoRI): Oligonukleotid, 28-mer;

5'-CAGGAATTCATGACCCTCAGCCCTATAC-3';

- Primer Ac2085<(HindIII): Oligonukleotid, 28-mer;

5'-CAGAAGCTTATGACCCTCAGCCCTATAC-3';

- Primer SaFsDs1: Oligonukleotid, 36-mer;

5'-TTTGTGCGACGTGCGCACTCCATATTGCAGTCATCCC-3';

- Primer XhDs1: Oligonukleotid, 31-mer;

5'-TTTCTCGAGGCTCATGGTTACTTCCTAATCG-3'

Nachweis der *empty donor site*:

- Primer 35S367: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-TGACGCACAATCCCACTATC-3'

- Primer bar1392<: Oligonukleotid, 19-mer;

5'-GCTCGGTACGGAAGTTGAC-3';

Nachweis von Ac in der Zuckerrübe:

- Primer Ac8: Oligonukleotid, 21-mer;

5'-TCCAATAAAGTCCCGTGTCAC-3';

- Primer Ac9: Oligonukleotid, 22-mer;

5'-CTTCATTAGTTCTTCCCACTGC-3';

Nachweis von *Ds* in der Zuckerrübe:

- Primer Ds751: Oligonukleotid, 22-mer;

5'-TCCATATAAATCTGGAGCACAC-3';

- Primer Ds1153<: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-GAGGTAAAAAACGAAAACGG-3';

Nachweis von *bar* in der Zuckerrübe:

- Primer bar1343: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-CATCGTCAACCACTACATCG-3';

- Primer bar1777<: Oligonukleotid, 19-mer;

5'-AAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3';

Nachweis der Integration (IPCR)

- Primer 469(L20): Oligonukleotid, 20-mer;

5'-CCGACCGTTTTTCATCCCTAT-3';

- Primer 568(L30): Oligonukleotid, 30-mer;

5'-TTACCGTATTTATCCCGTTCGTTTTCGTTA-3';

- Primer 1099(U21): Oligonukleotid, 21-mer;

5'-CGTTTCCGTTTACCGTTTTGT-3';

- Primer I(Ds1)-108: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-CCGTTTTCGTTTTTTACCTC-3'

- Primer I(Ds1)-137: Oligonukleotid, 21-mer;

5'-TTTACCGTTTTGTATATCCCG-3'

- Primer I(Ds2)94<: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-TATATCCCGTTTTCGTTTCC-3'

- Primer I(Ds2)212<: Oligonukleotid, 21-mer;

5'-TTTTCATGTGTGATTTTACCG-3'

Nachweis der Integrationsorte in der Zuckerrübe:

- Primer I6-8\_L2: Oligonukleotid, 21-mer;

5'-CCGTTCCATAGTAGGTGAAAC-3';

- Primer I6-8\_U2: Oligonukleotid, 23-mer;

5'-GAACGTTTCAGAATCAGTGAAAC-3';

- Primer Int155: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-TACCTGCATGACATATTGGC-3';

- Primer Int583<: Oligonukleotid, 21-mer;

5'-GGTTTAACGCTTCAGACATTC-3';

Nachweis der Transkripte in der Multiplex-PCR für *Ac*, *dhfr* und *gapC*

- Primer Ac1710: Oligonukleotid, 21-mer;

5'-GTGAAAAGGATCATGGCAAAG-3'

- Primer Ac2419: Oligonukleotid, 22-mer;

5'-CTTCATTAGTTCTTCCCACTGC-3'

- Primer dhfr8: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-GACCATTGAACTGCATCGTC-3'

- Primer dhfr522<: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-TTTTTCCTCTGGACCTCAG-3'

- Primer gapC\_L: Oligonukleotid, 25-mer;

5'-GGAATTGTTGAGGGTCTTATGACTA-3'

- Primer gapC\_R: Oligonukleotid, 25-mer;

5'-CTGACAGTAAGGTCAACAACTGAGA-3'

Nachweis von *uidA*(GUS) bei der Gateway-Klonierung

- Primer gus\_L: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-GGCTATACGCCATTTGAAGC-3';

- Primer gus\_R: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-CATGACGACCAAAGCCAGTA-3';

Nachweis von *Ds*-Transkripten in Tabak

- Primer Ds(-112/25): Oligonukleotid, 25-mer;

5'-CGTTCCGTTTTCGTTTTTTACCTCG-3';

- Primer T28NN: Oligonukleotid, 30-mer;

5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTNN-3';

Primer für Sequenzierungen von Fragmenten im pCR2.1 Vektor

- Primer M13revers: Oligonukleotid, 24-mer;

5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3';

- Primer T7: Oligonukleotid, 23-mer;

5'-TGTAATACGACTCACTATAGGGC-3';

Primer für Sequenzierungen der klonierten Fragmente

- Primer Acc(1345/1800): Oligonukleotid, 21-mer;

5'-TGGCCAAAGGTTATCACAAAC-3';

- Primer Acst-91<: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-GTATATCCCGTTTTTCGTTTC-3';

- Primer Ds1: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-GATATACAAAACGGTAAACG-3';

- Primer I(Ds1)-108: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-CCGTTTTTCGTTTTTTACCTC-3';

- Primer Int164<: Oligonukleotid, 22-mer;

5'-TATCTTCTTCGTCTTACACATC-3';

- Primer Int670: Oligonukleotid, 21-mer;

5'-GTCGAACATGAATAACAAGG-3';

- Primer Ocs44<: Oligonukleotid, 20-mer;

5'-AATATCATGCGATCATAGGC-3';

- Primer RB19<: Oligonukleotid, 19-mer;

5'-GGGAAACGACAATCTGATC-3';

## 2.8 Plasmide

Plasmidbezeichnung	Beschreibung/Verwendung	Referenz/Bezugsquelle
p70SRUC	Luciferase-Gen aus <i>Renilla reniformis</i>	Stahl <i>et al.</i> 2004
pART27	binärer Transformationsvektor	Gleave 1992
pCR2.1	TA-Klonierung/ Sequenzierung	Invitrogen
pENTR-GUS	Gateway-Klonierungssystem	Invitrogen
pGUS3	GUS-Gen aus <i>E. coli</i>	Köhler <i>et al.</i> 1995
pHannibal	Klonierungsvektor	Wesley <i>et al.</i> 2001
pLH5000	binärer Transformationsvektor	Hausmann und Toepfer 1999
pOCA28	binärer Transformationsvektor	Olszewski <i>et al.</i> 1988
pVKH-35S-pA	binärer Transformationsvektor	Reintanz 2002
pVKHDSOpGUS1	DspOp mit promotorlosem GUS-Gen	Hehl, pers. Mitteilung
pVKIGAL4	LhG4-Konstrukt	Moore <i>et al.</i> 2006

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Plasmidvektoren für die Klonierungen

## 2.9 In vitro Konstrukte

### 2.9.1 Ac/Ds-Konstrukte, die bei Beginn der Arbeit vorhanden waren

pUCAc9 (Wirtz 1989):

Das 4,6kb große Ac(Sall)-Fragment wurde in die Sall-Schnittstelle von pUC19 inseriert. Der Vektor besitzt für die Selektion in Bakterienzellen ein Carbenicillin-Resistenzgen.

p35S-*bar* (Hehl, pers. Mitteilung):

Klonierungsvektor mit *bar*-Gen (BastaResistenz) unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors. Die Kasette 35S-*bar* kann als HindIII-Fragment aus dem Vektor isoliert werden.

pBasta*DspOp2* (Hehl, pers. Mitteilung):

Das *DspOp*-Element befindet sich zwischen 35S-Promotor und dem *bar*-Gen. Das *DspOp* ist so orientiert, dass die Abfolge von Operator und Minimalpromotor (pOp) innerhalb der Ds-Enden die gleiche Orientierung aufweist wie 35S-Promotor und *bar*-Gen.

pBasta::*DsHyg* (Hehl, pers. Mitteilung):

Klonierungsvektor mit *DsHyg* zwischen 35S-Promotor und *bar*-Gen. Das *DsHyg* enthält ein Hygromycin-Resistenzgen zwischen den Ds-Enden. Die Kassette 35S-*DsHyg-bar* (= *bar*::*DsHyg*) kann als HindIII-Fragment aus dem Vektor isoliert werden.

UW1569 = *Ac1569* (Osborne *et al.* 1995):

Es handelt sich um den binären Vektor LcH, in dessen T-DNA Bereich sich ein doppelter 35S-CaMV-Promotor und ein *Ac-Ac3* Konstrukt befinden. Dieses Konstrukt exprimiert die Transposase, ist jedoch nicht zur Transposition fähig. Der Promotor enthält eine `mut B`-Punktmutation zur Verstärkung der Expression.

UW1596 = *Ac1596* (Osborne *et al.* 1995):

Es handelt sich um den binären Vektor LcH, in dessen T-DNA Bereich sich ein doppelter 35S-CaMV-Promotor und ein *Ac/BanII-Nos3*-Konstrukt befinden. Dieses Konstrukt exprimiert die Transposase, ist jedoch nicht zur Transposition fähig. Der Promotor enthält eine `mut B`-Punktmutation zur Verstärkung der Expression.

pVKH*bar*::*DspOp1* (Hehl, pers. Mitteilung):

Das *Ds* wurde aus einem *Ac9/Sall*-Fragment gewonnen (Laufs *et al.*, 1990). Es besteht aus 254bp vom 5'-Ende des *Ac* (= *Ds1*) und 320bp vom 3'-Ende des *Ac* (= *Ds2*). Die Enden wurden über einen *XhoI*-Linker zum Element *Ds1/2* verbunden (Wirtz *et al.* 1997). In den Linker wurde die Sequenz des *lac*-Operators mit Minimalpromotor (pOp) kloniert (Moore *et al.* 1998). Dieses *DspOp*-Konstrukt wurde in den nicht translatierten leader-Bereich des *bar*-Gens eingefügt (= *bar*::*DspOp1*). Im T-DNA Abschnitt des Vektors befindet sich auch

ein Hygromycin-Resistenzgen für die Selektion in Pflanzen.

pVKH*bar::DspOp2* (Hehl, pers. Mitteilung):

Dieses Plasmid ist analog zu pVKH*bar::DspOp1*, jedoch befindet sich das *DspOp* in umgekehrter Orientierung im *bar*-Gen.

### 2.9.2 *Ac/Ds*-Konstrukte zur stabilen Transformation in Zuckerrüben

pOCA28*bar::Ac9*

Der pOCA28 ist ein binärer Vektor zur Pflanzentransformation (Olszewski *et al.* 1988; Honma *et al.* 1993). Das Konstrukt enthält das 35S-*bar*-Gen, in dessen nicht translatierten leader-Bereich, zwischen 35S-Promotor und kodierender Region von *bar*, das *Ac9*-Gen integriert ist. Bei *Ac9* handelt es sich um das *Ac*-Transposon, welches aus dem *waxy locus* der Mais-Mutante wx-m9 isoliert wurde (Fedoroff *et al.* 1983, Pohlman *et al.* 1984). Das *Ac9* wurde als Sall-Fragment aus dem Plasmid pUCAc9 gewonnen. Da das *Ac9* in die BamHI *site* des 35S-*bar*-Gens kloniert werden sollte, nachdem das 35S-*bar* zuvor in pOCA28 integriert wurde, musste zunächst die in der mcs von pOCA28 vorhandene BamHI *site* deletiert werden. Der Vektor pOCA28 wurde mit BamHI geschnitten, die überstehenden Enden aufgefüllt und religiert. Der mit HindIII gespaltene Vektor pOCA28ΔBamHI wurde dephosphoryliert und mit einem 35S-*bar*(HindIII)-Fragment aus dem Vektor p35S-*bar* ligiert. Der daraus resultierende Vektor pOCA28*bar* wurde mit BamHI gespalten, die überstehenden Enden mit A und G partiell aufgefüllt und dephosphoryliert. Die Enden des *Ac9*(Sall)-Fragments wurden partiell mit C und T aufgefüllt und mit dem Vektor ligiert. Der Vektor pOCA28*bar::Ac9* enthält im TDNA-Abschnitt ein Kanamycin-Resistenzgen für die Selektion in Pflanzen.

pOCA28*bar::DsHyg1* = *DsHyg1*:

Dieses Konstrukt enthält ein Hygromycin-Resistenzgen, das von den *Ds*-Enden flankiert ist. Dies ermöglicht die Selektion der transformierten Pflanzen auf Anwesenheit des *Ds*-Elements. Das *DsHyg* befindet sich im nicht translatierten leader des oben beschriebenen 35S-*bar*-Gens. Das *bar::DsHyg*(HindIII)-Fragment aus dem Vektor pBasta::*DsHyg* wurde in die HindIII-Schnittstelle der multi cloning *site* von pOCA28 ligiert.



pOCA28*bar::DsHyg2* = *DsHyg2*

Dieses Konstrukt entspricht dem Konstrukt pOCA28*bar::DsHyg1*, jedoch befindet sich das *DsHyg*-Fragment in umgekehrter Orientierung im *bar*-Gen.

### 2.9.3 Konstrukte zur Analyse der *Ac*-Transkriptmenge in *Arabidopsis thaliana*

Zur Untersuchung, ob die *ihp*-Elemente die Transkriptmenge der *Ac*-Transposase reduzieren, wurden T-DNA Vektorkonstrukte erstellt, die zum einen ein *Ac*-TPase-Fragment fusioniert mit einem GUS-Gen enthalten, zum anderen ein *ihp*-Element. Die Vektoren wurden in *Arabidopsis thaliana* transformiert.

Für diese Konstrukte wurde zunächst das promotorlose GUS-Gen mit *ocs*-Terminator aus dem Vektor pGUS3 durch *EcoRI*/*Bam*HI Spaltung gewonnen und in den mit *EcoRI*/*Bam*HI geschnittenen Vektor pLH5000*Ac*(1) (Abschnitt 2.9.4) ligiert. Der daraus resultierte Vektor *Acg* enthält eine *in frame* Fusion vom vorderen Teil des *Ac* (1500bp beginnend mit ATG) und dem kodierenden Bereich der  $\beta$ -Glucuronidase. In den Vektor *Acg* wurde in die *MssI* site das *Ruc* *PvuII* Fragment einkloniert. Dieses wurde aus dem Vektor p70SRUC durch *PvuII* Verdau isoliert und enthält einen doppelten 35S-Promotor, das Gen für die *Renilla* Luciferase und einen 35S Terminator. Der entstandene Vektor trägt die Bezeichnung *Acg-R*. Die korrekte Klonierung der Fragmente wurde durch Restriktionsspaltungen überprüft und zusätzlich wurden folgende Übergangsbereiche von den klonierten Fragmenten zum jeweiligen Vektor sequenziert: pLH5000*Ac*(1)--GUS mit Primer *Acc*(1345/1899) und *Acg--RUC* mit Primer RB19< (Daten nicht gezeigt).

Das Vektor-Konstrukt *Acg-ihp200* enthält zusätzlich zum *Ac*-GUS Fusionskonstrukt das *ihp200* Element. Für die Klonierung wurde das *ihp200* aus dem Vektor pHanni-*ihp200* (Abschnitt 2.9.4) durch *NotI*-Spaltung isoliert und in den *NotI* gespaltenen Vektor pCR2.1 ligiert. Anschließend wurde das *ihp200* durch *BclI*-Spaltung zurückgewonnen und in die *BclI* site des Vektors *Acg* eingebracht. In den Vektor *Acg-ihp200* wurde danach das *Ruc* *PvuII* Fragment in die *MssI* site einkloniert. Der daraus resultierende Vektor trägt die Bezeichnung *Acg-R-ihp200*. Die korrekte Klonierung der Fragmente wurde durch Restriktionsspaltungen überprüft.

Die Herstellung von *Acg-R-ihp400* erfolgte analog zu *Acg-R-ihp200* nur mit dem längeren *ihp*-Element (Abschnitt 2.9.4).

### 2.9.4 Konstrukte für die Markergeneliminierung

Der Aufbau der Vektorkonstrukte für die Markergeneliminierung pADi4R, pADi2R-a und pADi2R-b ist in Abbildung 3.9 (Seite 75) schematisch dargestellt. Diese beruhen auf dem T-DNA Vektor pLH5000, in den schrittweise alle Komponenten eingefügt wurden.

Für die Erstellung des Vektorkonstrukts pLH5000Acst wurde zunächst das stabile Acst Element aus dem Vektor UW1550 in den binären T-DNA Vektor pLH5000 umklontiert. Hierzu wurde ein Sall/EcoRI-Fragment aus dem Vektor UW1550, bestehend aus 35S-Promotor und einem Teil der Ac-Transposase in den Sall/EcoRI verdauten Vektor pLH5000 ligiert. Der resultierende Vektor pLH5000Ac(1) wurde anschließend mit EcoRI/BamHI gespalten und mit einem EcoRI/BamHI-Fragment aus UW1550, das den hinteren Bereich des Ac enthält, zusammengefügt. Im entstandenen Vektor pLH5000Acst wurden die Übergänge vom Acst zum Vektor durch Sequenzierung bestätigt. Es wurden die Primer Acst-91< und RB19< verwendet (Abschnitt 2.7).

In diesen Vektor pLH5000Acst wurden die ihp-Elemente einkloniert. Dazu wurde zunächst der *sense* und *antisense* Bereich für die ihp-Elemente mittels *proofread*-Polymerase aus Plasmid-DNA mit Ac9 amplifiziert. Die Primer besitzen am 5'-Ende jeweils einen Überhang mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen. Die amplifizierten Fragmente wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und aufgereinigt. Die Tabelle 2.3 zeigt die für die PCR verwendeten Primer, und die resultierenden Fragmente, die nach der Behandlung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen erhalten wurden.

Element	Primer1	Primer2	Resultierendes Fragment
ihp200	Ac1742(XhoI)	Ac1954<(EcoRI)	Ac-sense200Xho/Eco
	Ac1742(XbaI)	Ac1954<(HindIII)	Ac-sense200Xba/Hind
ihp400	Ac1685(XhoI)	Ac2085<(EcoRI)	Ac-sense400Xho/Eco
	Ac1685(XbaI)	Ac2085<(HindIII)	Ac-sense400Xba/Hind

Tabelle 2.3: Bezeichnungen der Primer und PCR-Produkte für die ihp-Konstrukte

Im Folgenden wurden die Fragmente Ac-sense200Xho/Eco (sense200) und Ac-sense400Xho/Eco (sense400) in den Vektor pHannibal über die Xho/Eco Schnittstellen zwischen 35S-Promotor und *pdk*-Intron einkloniert. Danach wurden die Fragmente Ac-

sense200Xba/Hind (antisense200) und *Ac*-sense400Xba/Hind (antisense400) über die Hind/Xba in umgekehrter Orientierung zwischen *pdh*-Intron und *ocs*-Terminator eingebracht. Es entstanden die Vektoren pHanni-ihp200 und pHanni ihp400. Um geeignete Restriktionsschnittstellen für die weiteren Klonierungsschritte zur Verfügung zu haben, wurden die Elemente ihp200 und ihp400 mit NotI in den Vektor pCR2.1 umkloniert und als BclI-Fragmente zurückgewonnen. Diese BclI-Fragmente wurden jeweils in den mit BclI verdauten Vektor pLH5000-Acst eingebracht, woraus die Vektorkonstrukte Acst-ihp200 und Acst-ihp400 hervorgingen. Die korrekte Klonierung der Fragmente wurde durch Restriktionsspaltungen überprüft und zusätzlich wurden folgende Übergangsbereiche zwischen den klonierten Fragmenten sequenziert: sense200--*pdh* mit Primer Int164<, *pdh*--antisense200 mit Primer Int670, antisense200--*ocs* mit Primer Ocs44<, sense400--*pdh* mit Primer Int164<, *pdh*--antisense400 mit Primer Int670, antisense400--*ocs* mit Primer Ocs44<, pLH5000Acst--ihp200 mit Primer Acst-91<, pLH5000Acst--ihp400 mit Primer Acst-91< (Daten nicht gezeigt).

Das *Ds*-Element, welches aus 251bp vom 5'-Ende des *Ac* (*Ds1*) und 321bp vom 3'-Ende (*Ds2*) besteht, wurde zunächst in den pCR2.1 Vektor eingefügt, um zwischen den *Ds*-Enden eine Schnittstelle für das spätere Einklonieren der Gateway-Kassette zu generieren. Dazu wurde als erstes das *Ds2* mit HindIII und XhoI aus dem Vektor pBastaDspOp2 isoliert und in den XhoI/HindIII gespaltenen Vektor pCR2.1 eingebracht (pCR2.1*Ds2*). Das *Ds1* wurde mittels PCR mit pBastaDspOp2 als *template* und den Primern Xh*Ds1*/SaF*Ds1* amplifiziert, welche die Schnittstellen für die Klonierung des PCR-Fragments anfügen. Das mit XhoI und Sall gesplante und aufgereinigte PCR-Fragment wurde in die XhoI *site* von pCR2.1*Ds2* kloniert, die auch für Sall geschnittene Enden kompatibel ist (pCR2.1*Ds21*). Das *Ds21* wurde mit Sall und XhoI aus dem Vektor ausgeschnitten und in die XhoI *site* der Vektoren pHanni-ihp200 und pHanni-ihp400 zwischen 35S-Promotor und *sense*-Bereich der ihp-Elemente eingefügt. Aufgrund der kompatiblen Sall- und XhoI-Enden kann das *Ds21*-Fragment in beiden Orientierungen in die Vektoren integrieren. Es wurde mit beiden Orientierungen von *Ds* im ihp200-Element weitergearbeitet, jedoch nur mit dem revers integrierten *Ds* im ihp400-Element. Aus diesen Vektoren wurden die ihp-Fragmente mit integriertem *Ds* mit NotI in den Vektor pCR2.1 umkloniert und als BclI-Fragmente zurückgewonnen. Diese BclI-Fragmente wurden jeweils in den mit BclI gespaltenen Vektor pLH5000Acst ligiert. Daraus gingen die Vektorkonstrukte pADi4, pADi2-a und pADi2-b (plasmid, Acst, ihp200/400) hervor. Die beiden Letztgenannten unterscheiden sich in der Orientierung des ihp-Elements und des

*Ds*-Elements innerhalb des *ihp*, bezogen auf die Richtung der T-DNA von rechter zu linker *border*. Bei pADi2-a liegt das *Ds* innerhalb des *ihp200*-Elements in reverser Orientierung vor. Bei pADi2-b liegt das gesamte *ihp*-Element mit *Ds* in reverser Orientierung vor. Die korrekte Klonierung der Fragmente wurde durch Restriktionsspaltungen bestätigt. Zusätzlich wurden durch Sequenzierungen die Übergangsbereiche des *Ds21* im *ihp200* bzw. 400 mit den Primern I(*Ds1*)-108 und *Ds1* überprüft.

Als letztes Element wurde die *RfB*-Kassette des Gateway-Klonierungssystems einkloniert. Diese Kassette enthält die *attachment sites* (*att*), das *ccdB*-Gen und das *cat*-Gen und wurde als Fragment mit glatten Enden vom Hersteller (Invitrogen) bereitgestellt. Die Kassette wurde in die *FspAI* *site* der Vektoren pADi4, pADi2-a und pADi2-b eingebracht. Bei dieser Klonierung sind für die *RfB*-Kassette wieder beide Orientierungen möglich. Durch Integration in reverser Orientierung von *RfB* in pADi4 entstand pADi4R. Durch Integration der *RfB*-Kassette in annotierter Orientierung in pADi2-a entstand pADi2R-a. Durch Integration von *RfB* in reverser Orientierung in pADi2-b entstand pADi2R-b. Die Vektorkonstrukte pADi4R, pADi2R-a und pADi2R-b sind in Abbildung 3.9 (Seite 75) schematisch dargestellt. Die rekonstruierte Sequenz des T-DNA Bereichs, die durch Sequenzierung der Übergänge der Klonierungsstellen verifiziert wurde, ist für pADi4R in Anhang 7.1 aufgeführt.

### 2.9.5 Konstrukte für das Aktivierungstaggung in Tabak

#### pVKH-*DsKan1*

Dieses Konstrukt enthält ein *Ds*-Element mit einem *npftII*-Gen, um die Anwesenheit des transponierten *Ds*-Elementes in Pflanzen durch Selektion mit Kanamycin verfolgen zu können. Das *npftII* befindet sich zwischen der *Ds1*- und der Operator-Sequenz. *NpftII* mit nos Promotor und Terminator wurde mit *PvuI* und *TatI* aus dem Vektor pART27 isoliert. Die überhängenden Enden wurden zu glatten Enden aufgefüllt und das Fragment in den mit *Ml**I* geschnittenen Vektor pBasta*DspOp2* ligiert. Aus diesem Vektor wurde die Kassette 35S-*DsKanOpDs-bar* mit *HindIII* in den binären Vektor pVKH umklont. Die Integration erfolgt hinter einen bereits vorhandenen 35S-Promotor, sodass die Kassette letztlich mit einem doppelten Promotor versehen ist, der nach der Exzision des *DsKan*-Elements die starke Expression des *bar*-Gens vermitteln soll.

## pVKHDSOpGUS1

Es handelt sich bei diesem Konstrukt um ein promotorloses GUS-Gen, vor dem sich das *DspOp*-Element befindet. Mit diesem Konstrukt wurde in Zusammenhang mit LhG4 die Transkriptionsaktivierung und IPTG-Regulierbarkeit *in planta* getestet.

## 2.10 Pflanzenlinien

### 2.10.1 *Beta vulgaris hairy roots*

Durch Kotransformation mit *A. tumefaciens* und *A. rhizogenes* wurden transgene *hairy root* Linien mit *Ac*- und *Ds*-Elementen erzeugt. Das transgene Wurzelmaterial kann durch Schneiden und Auslegen auf entsprechendes Medium über eine gewisse Zeit vermehrt werden. Die Regenerierung von intakten und vermehrungsfähigen Zuckerrübenpflanzen ist jedoch nicht möglich.

Die für die Analysen der Transposition in Zuckerrüben verwendeten Linien tragen die in der Tabelle 2.4 aufgeführten *Ac*- bzw. *Ds*-Elemente. Die Transformation ist in Abschnitt 2.11 beschrieben.

<i>Hairy root</i> Linie	<i>Ac</i> -Element (Transformationsvektor)	<i>Ds</i> -Element (Transformationsvektor)
Hr36-11	35S- <i>Ac</i> -nos (UW1596)	<i>DspOp</i> 1 (pVKH <i>bar</i> :: <i>DspOp</i> 1)
Hr36-15	35S- <i>Ac</i> -nos (UW1596)	<i>DspOp</i> 1 (pVKH <i>bar</i> :: <i>DspOp</i> 1)
Hr36-43	35S- <i>Ac</i> -nos (UW1596)	<i>DspOp</i> 2 (pVKH <i>bar</i> :: <i>DspOp</i> 2)
Hr36-48	35S- <i>Ac</i> -nos (UW1596)	<i>DspOp</i> 2 (pVKH <i>bar</i> :: <i>DspOp</i> 2)
Hr35-19	35S- <i>Ac</i> - <i>Ac</i> 3 (UW1569)	<i>DspOp</i> 1 (pVKH <i>bar</i> :: <i>DspOp</i> 1)
Hr35-22	35S- <i>Ac</i> - <i>Ac</i> 3 (UW1569)	<i>DspOp</i> 1 (pVKH <i>bar</i> :: <i>DspOp</i> 1)
Hr35-39	35S- <i>Ac</i> - <i>Ac</i> 3 (UW1569)	<i>DspOp</i> 2 (pVKH <i>bar</i> :: <i>DspOp</i> 2)
Hr35-43	35S- <i>Ac</i> - <i>Ac</i> 3 (UW1569)	<i>DspOp</i> 2 (pVKH <i>bar</i> :: <i>DspOp</i> 2)
Hr35-54	35S- <i>Ac</i> - <i>Ac</i> 3 (UW1569)	<i>DspOp</i> 2 (pVKH <i>bar</i> :: <i>DspOp</i> 2)
Hr35-66	35S- <i>Ac</i> - <i>Ac</i> 3 (UW1569)	<i>DspOp</i> 2 (pVKH <i>bar</i> :: <i>DspOp</i> 2)

Tabelle 2.4: *Hairy root* Linien zur Untersuchung der Transposition in der Zuckerrübe

### 2.10.2 *Beta vulgaris*

Das Zuckerrübensaatgut wurde von der KWS/Planta GmbH zur Verfügung gestellt.

Die Tabelle 2.5 listet die Bezeichnung und die Konstrukte in den Kreuzungspartnern auf, aus denen die Linien der F1-Generation hervorgegangen sind:

Linienbezeichnung	Konstrukt in der Elternpflanze	Kreuzungspartner
1109D	<i>Ac1596/DsHyg2</i>	Selbstung
1110D	<i>Ac1596/DsHyg2</i>	Selbstung
1102D	<i>Ac9</i>	Selbstung
1103D	<i>Ac9</i>	Selbstung
1107D	<i>Ac1569/DsHyg1</i>	Selbstung
1108D	<i>Ac1569/DsHyg1</i>	Selbstung
002D	<i>Ac9</i>	Wt (6B2840)
001R	<i>Ac9</i>	Wt (8T0015)
002R	<i>Ac9</i>	Wt (8T0015)
3W	Wt (8T0015)	Selbstung
5W	Wt (6B2840)	Selbstung

Tabelle 2.5: Zuckerrübenlinien mit *Ac* und *Ds*-Elementen zur Untersuchung der Transposition

Die Transformationen wurden bei der KWS/Planta GmbH (Einbeck) nach internen Protokollen durchgeführt.

Aufgrund eigener Untersuchungen (Anhang 7.2) wurde festgestellt, dass die transgenen Zuckerrübenlinien teilweise andere Elemente enthalten, als von der KWS/Planta GmbH angegeben. Diese Tatsache wurde bei den weiteren Analysen berücksichtigt.

Eine weitere Linie wurde in der Diplomarbeit von Kristin Schnettler (2003) untersucht. Hierbei handelte es sich um die Primärtransformante MEZ21 mit *pOCA28bar::Ac9*.

### 2.10.3 *Arabidopsis thaliana*

Die transgenen *Arabidopsis thaliana* Linien wurden mittels *floral dip* Transformation des Ökotyps Col-0 hergestellt (Abschnitt 2.14).

Alle erzeugten *Arabidopsis*-Linien, die verwendet wurden, sowie die Konstrukte, die sie

enthalten, sind in Tabelle 3.2 (Seite 72) aufgeführt.

#### 2.10.4 *Nicotiana tabacum*

Die transgenen Tabakpflanzen wurden durch Blattscheibentransformation der Sorte SR1 (Petit Havanna) hergestellt (Abschnitt 2.13)

Für die Untersuchung des Aktivierungstaggings wurden zum einen Pflanzenlinien, ausgehend von den in Tabelle 2.6 aufgelisteten Primärtransformanten mit entsprechenden *Ac* und *Ds* Konstrukten, generiert. Weiterhin wurden bereits vorhandene Tabaklinien verwendet. Die Linie Ac3-13-6 enthält mehrere Kopien von *Ac9* (Hehl, pers. Mitteilung) und die Linie 1-1 enthält *DspOp-Hyg* (Diplomarbeit Streitner 2003).

Transformante/Linie	Konstrukt	Transformationsvektor
A1	<i>Acst</i>	UW1569
A3	<i>Acst</i>	UW1569
D1-1a	<i>DspOpKan</i>	pVKH- <i>DsKan1</i>
D1-1b	<i>DspOpKan</i>	pVKH- <i>DsKan1</i>

Tabelle 2.6: Primärtransformanten mit *Ac/Ds*-Konstrukten für das Aktivierungstaggging

Die in Tabelle 2.6 aufgeführten Pflanzen wurden mit Wildtyppflanzen gekreuzt und selbstbestäubt. Außerdem wurden zwischen den A und D-Linien Kreuzungen durchgeführt, woraus die AD-Linien in Tabelle 2.7 hervorgingen.

Linie	Elternpflanze 1	Elternpflanze 2
AD3	A1	D1-1a
AD22	A3	D1-1a
AD23-I	A3	D1-1b
AD23-II	A3	D1-1b

Tabelle 2.7: Kreuzungspartner aus denen die AD-Linien hervorgingen (I und II sind zwei unabhängige Kreuzungen derselben Elternpflanzen)

Die Pflanzen der AD-Linien wurden auf Medium mit Kanamycin und Phosphinothricin angezogen, um auf Anwesenheit von *Ds* und auf erfolgte Transposition zu selektieren.

Die selektierten Pflanzen wurden mit Pflanzen, die den Transkriptionsaktivator LhG4 tragen (L-Linie, siehe unten), sowie mit Wildtyppflanzen (W-Linie) gekreuzt, woraus die Nachfolgegenerationen ADL bzw. ADW hervorgingen. In der Tabelle 2.8 sind den durchnummerierten ADL/ADW-Linien die zugehörigen AD-Linien zugeordnet.

ADL/ADW 1 bis ADL/ADW 36	AD3 (Ppt+ Kan+)
ADL/ADW 37 bis ADL/ADW 96	AD22 (Ppt+ Kan+)
ADL/ADW 97 bis ADL/ADW 110	AD23-I (Ppt+ Kan+)
ADL/ADW 111 bis ADL/ADW 120	AD23-II (Ppt+ Kan+)

*Tabelle 2.8: Tabaklinien für das Phänotypen-Screening mit transponiertem DspOp (ADW-Linien) und zusätzlich dem Transkriptionsaktivator LhG4 (ADL-Linien)*

Für das Phänotypen-Screening in Erdkultur wurde Saatgut verwendet, das aus Selbstungen zweier Linien gewonnen wurde (Diplomarbeit Streitner 2003). Die Elternpflanzen waren jeweils Phosphinotricin-resistente Nachkommen der Kreuzung aus DspOp-Pflanzen und Ac9(6x)-Pflanzen, die mit homozygoten LhG4-Pflanzen gekreuzt wurden.

Für die GUS-Assays G#: 3-# (Abbildung 3.12, Seite 79) zur Untersuchung der Transkriptionsaktivierung und der IPTG-Regulierbarkeit des Transkriptionsaktivators LhG4 wurden bereits etablierte Pflanzenlinien analysiert (Studienarbeit Hartleben 2001). Die Linien stammen aus Kreuzungen zwischen DspOp-GUS-Transformanten mit dem Vektorkonstrukt pVKHDSOpGUS1 und homozygoten LhG4-Pflanzen. Das Tabaksaatgut der LhG4-Linie (L-Linie) mit dem Vektorkonstrukt pVKIGAL4 wurde vom Max-Delbrück-Laboratorium (Köln) zur Verfügung gestellt. Die nach der Kreuzung erhaltenen Samen wurden mit Hygromycin und Methotrexat auf die Anwesenheit der beiden Elemente, Ds und LhG4, selektiert. Die Kontrollpflanzen ohne Transkriptionsaktivator stammen jeweils aus den Selbstungen der DspOp-GUS Transformanten und wurden auf Hygromycin-haltigem Medium angezogen.



## 2.11 Transformation und Selektion von Zuckerrüben *hairy roots*

Die Transformation mit Agrobakterien wurde an Zuckerrübensprösslingen der Sorte VRB (Genotyp 2B0035) bei der KWS/Planta GmbH durchgeführt.

Dieser Abschnitt beschreibt die Tripletransformation zur Erzeugung von *hairy roots* mit *Agrobacterium rhizogenes* und zwei Kulturen von *Agrobacterium tumefaciens*. *A. rhizogenes* vermittelt die Bildung von *hairy roots* durch entsprechende Gene auf der T-DNA. Die T-DNAs aus *A. tumefaciens* tragen jeweils ein *Ac*- beziehungsweise *Ds*-Element, jedoch keine tumorerzeugenden Gene. Da erfahrungsgemäß (mündliche Mitteilung von KWS/Planta-Mitarbeitern) die Transformationseffizienz von *A. rhizogenes* gegenüber *A. tumefaciens* etwa 1000 mal höher liegt, ist es wahrscheinlich, dass verwundete Pflanzenzellen, die *A. tumefaciens* T-DNA aufgenommen haben, auch *A. rhizogenes* T-DNA enthalten. Mit *A. rhizogenes* T-DNA infizierte Zellen entwickeln *hairy roots*. Demnach wurde die erste Selektion nach diesem phänotypischen Merkmal vorgenommen.

Für die Transformation wurden die Zuckerrübensprösslinge in Pflanzschalen mit MS/BAP-Medium über 3-4 Wochen bis zu einer Größe von ca. 5cm herangezogen. Die Agrobakterienkulturen mit den jeweiligen Plasmiden wurden von Platten gepickt und 24h in 5ml LB/R/C/K-Medium vermehrt. Aus dieser Vorkultur wurden 50µl in 50ml LB-Medium ohne Antibiotika überimpft und 21h inkubiert. Es wurde eine photometrische Dichtebestimmung durchgeführt und die Kulturen mit LB-Medium auf  $OD_{600}=0,4-0,6$  verdünnt, so dass alle Kulturen etwa die gleiche Zellkonzentration besaßen. Von diesen Ansätzen wurde je ein Bakterien-Mix für die Transformation hergestellt. In Tabelle 2.9 sind die Kombinationen der Bakterienkulturen angegeben, von denen je 4ml in einer Petrischale gemischt wurden.

Transformation	Bakterien-Mix		
	<i>A. rhizogenes</i>	<i>A. tumefaciens</i> ( <i>Ac</i> -Konstrukt)	<i>A. tumefaciens</i> ( <i>Ds</i> -Konstrukt)
Hr35	Ri 15834	Ac1569	DspOp1
Hr36	Ri 15834	Ac1569	DspOp2

Tabelle 2.9: Mischungen der Bakterienkulturen für die *hairy root* Transformationen

Die Blattstängel der Sprösslinge (Petiolen) wurden mit einem Skalpell in 0,5-1cm lange Stücke zerschnitten, für einige Sekunden in den entsprechenden Bakterien-Mix getaucht,

auf Filterpapier abgetupft und auf MS/BAP-Platten gelegt. Pro Bakterien-Mix wurden 120 Stängelstücke auf diese Weise behandelt und auf 8 Platten zu je 15 Stück verteilt.

Die Platten wurden für 2 Tage bei 24°C und einer Beleuchtung von 16h pro Tag kultiviert. Dann wurden die Petiolen zur Selektion auf Platten mit MS/BAP/C/T-Medium und zusätzlich Hygromycin (20mg/l) umgesetzt. Für diese erste Regenerations- und Vorselektionsphase erfolgte die Inkubation bei Dämmerlicht und 24°C über einen Zeitraum von 2 Wochen. Während dieses Zeitraums wurden die Petiolen alle zwei bis drei Tage auf frisches Medium mit entsprechenden Antibiotika umgesetzt. Es bildeten sich *hairy roots* an den Schnittstellen der mit *A. rhizogenes* infizierten Petiolen aus. Die im MS/BAP/C/T-Medium enthaltenen Antibiotika Carbenicillin und Timentin wirken bakterizid und richten sich gegen die Agrobakterien. Mit Hygromycin wird auf transformierte Pflanzenzellen selektiert, die *Ac*- bzw. *Ds*-Konstrukte enthalten.

In der zweiten Selektionsphase wurde der Selektionsdruck verstärkt, indem die Hygromycin-Konzentration auf 50mg/l erhöht wurde. Zudem wurde die Medienzusammensetzung verändert, um das Wachstum der *hairy roots* zu begünstigen. Die in der ersten Selektionsphase gebildeten Wurzeln wurden abgeschnitten und auf ½B5/C/T-Medium mit Hygromycin gesetzt. Je Platte wurden zwei Wurzelstücke aufgelegt. Nach ca. 4 Wochen Wachstum im Dunkeln bei 24°C wurden die Wurzeln erneut geschnitten und auf frisches Medium derselben Zusammensetzung gelegt. Nach weiteren 4 Wochen wurde die Selektion auf das Exzisionsereignis hin ausgerichtet. Die regenerierten Wurzeln wurden erneut geschnitten und auf frisches Medium mit Phosphinothricin (3mg/l) gesetzt. Nach ca. 4 Wochen wurden die *hairy roots* vereinzelt und die Phosphinothricin-Konzentration im neuen Medium auf 6mg/l verdoppelt. Nach der Regeneration wurde dieses Wurzelmaterial molekularbiologisch untersucht. Über alle Phasen hinweg wurden zur Kontrolle jeweils auch *hairy roots* auf Medien ohne Antibiotika mitgeführt und die normale Regeneration beobachtet. Zur Langzeiterhaltung der *hairy roots* wurden diese im Abstand von etwa 8-12 Wochen vereinzelt und das Medium erneuert. Die Kulturbedingungen sind weiterhin 24°C und Dunkelheit.

### 2.12 Transformation und Selektion von Zuckerrüben

Die Transformation und Selektion von transgenen Zuckerrüben mit *Ac* und *Ds* Konstrukten wurde von der KWS/Planta GmbH in Einbeck nach internen Protokollen durchgeführt.

### 2.13 Transformation von Tabak

Für die Erzeugung von transgenen Tabakpflanzen wurde eine Blattscheibentransformation mit Agrobakterien durchgeführt (Horsch *et al.* 1985).

Zunächst wurden Tabakpflanzen der Sorte SR1 steril in Pflanzboxen mit MS-Medium für ca. 7 Wochen angezogen. Von den Blättern der Pflanzen wurde die Mittelrippe entfernt und das Blattgewebe in etwa 0,5cm<sup>2</sup> große Stücke zerschnitten. Aus einer angezogenen Agrobakterienkultur wurde die Zellen abzentrifugiert und in MS-Medium zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 resuspendiert. In dieser Suspension wurden die Blattstücke für 5 Minuten gebadet, danach auf sterilem Filterpapier getrocknet und mit der Unterseite nach oben auf MS-Platten ausgelegt. Nach Inkubation für 2-4 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Stücke auf kallusinduzierendes Medium MS/C transferiert. Dem Medium wurde zusätzlich noch das Hygromycin bzw. Kanamycin für die Selektion zugegeben, je nachdem welches Antibiotika-Resistenzgen im transformierten T-DNA Konstrukt vorlag. Nach 10 Tagen in der Lichtkammer (16 h Tag/ 8 h Nacht, 24°C) wurden die Blattstücke auf frisches Medium der gleichen Zusammensetzung umgesetzt. Die Blattstücke, die eventuell mit Agrobakterien bewachsen waren, wurden vor dem Umsetzen in MS-Medium mit 500mg/l Cefotaxim gewaschen und auf Filterpapier getrocknet. Nach weiteren 10-14 Tagen wurden die entstandenen Kalli abgeschnitten und auf sprossinduzierendes Medium MS/S mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum gelegt. Nach weiteren zwei bis drei Wochen bildeten sich Sprosse aus, die vom Kallus abgetrennt wurden und auf wurzelinduzierendes Medium MS/W mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum gesetzt wurden. Nach Ausbildung der Wurzeln wurden die Pflanzen in Erde gepflanzt und im Gewächshaus kultiviert.

### 2.14 Transformation, Selektion und Vermehrung von *Arabidopsis thaliana*

Die verwendeten transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden mittels der *floral dip* Methode (Clough und Bent 1998) mit nachfolgenden Spezifikationen hergestellt. Samen wurden in Pflanztöpfen mit Anzuchterde ausgesät und mindestens 48 Stunden bei 4°C stratifiziert. Um die Ausbildung möglichst vieler Infloreszenzen zu fördern, wurden die primären Infloreszenzen abgeschnitten. Etwa fünf Tage nach dem Schneiden und erneutem Austreiben der Infloreszenzen wurden die Pflanzen für die Transformation eingesetzt. Die angezogene Agrobakterien-Kultur wurde in 5% (w/v) Saccharose-Lösung

aufgenommen, sodass die OD<sub>600</sub> der Suspension 0,8 betrug und mit 0,025% Silwet-L77 versetzt. Nach dem Eintauchen der oberirdischen Pflanzenteile in die Bakteriensuspension wurden die Pflanztöpfe in Plastikschläuche eingepackt und für 48 Stunden im Halbschatten gelagert. Anschließend wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (16h Tag/ 8h Nacht) bei 24°C bis zur Samenreife angezogen.

Nach Selektion der Samen auf ½MS-Medium mit entsprechendem Antibiotika und Anzucht der Primärtransformanten, wurde durch Selbstbestäubung die F1-Generation gewonnen. Mit den Samen der F1-Generation wurde eine Segregationsanalyse durchgeführt, um die Anzahl der T-DNA Loci in den Primärtransformanten zu ermitteln. Es wurde nur mit Linien weitergearbeitet, die potentiell 1 bis 2 T-DNA Insertionsloci besaßen. Vier bis acht Pflanzen, die Wachstum auf dem Selektionsmedium zeigten, wurden in Erde transferiert und durch Selbstung in die F2-Generation überführt. Die Samen der F2-Generation wurden wieder einer Segregationsanalyse unterzogen, um die Zygotie der jeweiligen Elternpflanze zu ermitteln. Die homozygoten Linien wurden durch Selbstung weitervermehrt (F3). Für die RT-PCR Analysen wurden bevorzugt Pflanzen der F2 und der F3-Generation verwendet. Falls F2-Pflanzen verwendet wurden, deren Elternpflanze heterozygot war und demnach die Zygotie in der F2 undefiniert ist, wurde die Zygotie dieser analysierten Pflanzen durch Segregation der F3 nachträglich ermittelt. Alle Annahmen die aufgrund der Ergebnisse der Segregationsanalysen gemacht wurden, sind durch den Chi-Quadrat-Test abgesichert (Abschnitt 2.16).

### **2.15 Samensterilisation und Anzucht von *Arabidopsis thaliana***

Es wurden max. 40mg Samen in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben und 1ml Ethanol zugegeben, kurz gevortext und 60s bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ethanol wurde abpipettiert und 1ml Sterilisationslösung zugegeben. Während einer 5-10 minütigen Einwirkzeit bei Raumtemperatur wurde mehrmals kurz gevortext. Anschließend wurde 3x mit sterilem Wasser gewaschen und die Samen in 1ml 0,1%ige Agaroselösung aufgenommen.

Die sterilisierten Samen in der Agaroselösung wurden auf Platten mit ½MS-Medium und entsprechenden Antibiotika verteilt. Zur Synchronisierung der Keimung wurden die Platten für mindestens 48 Stunden bei 4°C stratifiziert. Die Keimung und das Wachstum erfolgte im Lichtschrank bei 24°C und Langtagbedingungen (16 h Tag/8h Nacht). Pflanzen, von

denen Samen benötigt wurden, wurden nach Ausbildung des 5-6 Folgeblatts in Erde umgesetzt und im Gewächshaus angezogen. Die Vermehrung erfolgte durch Selbstbestäubung. Nach Bildung des Sprosses wurden die Pflanzen mit Aracons versehen, um die Kreuzbestäubung der Pflanzen untereinander zu verhindern. Die gereiften, getrockneten Schoten wurden geerntet, die Samen durch Reiben zwischen zwei Blatt Papier heraus gelöst und über ein Teesieb von den übrigen Pflanzenteilen abgetrennt. Die Lagerung der Samen erfolgte in 1,5ml Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur im Dunkeln.

### 2.16 Segregationsanalysen und Chi-Quadrat-Test

Für die Segregationsanalysen der Arabidopsis- und Tabaklinien wurden mindestens 60, meistens 100-200 Samen auf Medium mit Antibiotikum, abhängig vom T-DNA Vektor mit dem transformiert wurde, ausgesät. Nach Keimung und kurzer Wachstumsphase wurden die resistenten und sensitiven Pflanzen ausgezählt. Das ermittelte Aufspaltungsverhältnis wurde mit dem erwarteten Verhältnis verglichen und einer Klasse zugeteilt. Die Verifizierung, ob die Zuteilung statistisch korrekt ist, wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt. Die folgenden Tabellen zeigen die erwarteten Aufspaltungsverhältnisse für die ermittelten Gruppen.

Anzahl T-DNA Loci	Resistente Pflanzen [%]	Sensitive Pflanzen [%]
1	75	25
2	93,75	6,25
3	98,44	1,56

*Tabelle 2.10: Aufspaltungsverhältnisse nach Selbstung heterozygoter Pflanzen in Abhängigkeit der T-DNA Insertionsloci*

Anzahl T-DNA Loci	Resistente Pflanzen [%]	Sensitive Pflanzen [%]
1	50	50
2	75	25
3	87,5	12,5
4	93,75	6,25

*Tabelle 2.11: Aufspaltungsverhältnisse nach Rückkreuzung heterozygoter Pflanzen mit Wt in Abhängigkeit der T-DNA Insertionsloci*

Der Chi-Quadrat-Test stellt ein statistisches Verfahren zur Ermittlung der Wahrscheinlichkeit dar, mit der experimentelle Daten den theoretisch geforderten entsprechen. Hintergrund ist die zufällige Verteilung der Gene auf die Gameten und deren zufallsbedingte Vereinigung zu Zygoten bei der Kreuzung. Die Folge ist, dass das Aufspaltungsverhältnis bei den Nachkommen einer statistischen Wahrscheinlichkeit unterliegt und es eine mehr oder weniger starke Abweichung zum theoretischen Idealwert gibt. Der Chi-Quadrat-Test ist ein Maß, ob trotz Abweichung des experimentell ermittelten Zahlenverhältnisses vom theoretisch vorhergesagten, eine Hypothese über die Aufspaltung bestätigt werden kann. Es ist somit ein Test zur Überprüfung einer Stichprobenverteilung. Mit folgender Formel wurde der Chi-Quadrat-Wert mit Yates Korrektur für einen Freiheitsgrad bestimmt (Hennig 1995):

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(|h_i - e_i| - 0,5)^2}{e_i}$$

mit

k = Anzahl der Klassen (resistente und sensitive)

h = hypothetische Häufigkeit (Anzahl der Pflanzen bei idealer Aufspaltung in der Klasse)

e = experimentelle Häufigkeit (Anzahl der experimentell gefundenen Pflanzen in der Klasse)

Das zugehörige Signifikanzkriterium  $\alpha$  der  $\chi^2$ -Verteilung lässt sich aus Tabellenwerken entnehmen. Als Grenzwert für das Zutreffen der Hypothese wurde der in der Biostatistik gängige kritische Signifikanzlevel auf  $\alpha=0,05$  festgelegt. Das bedeutet, dass die Hypothese für die Einteilung des gefundenen Aufspaltungsmusters in eine Gruppe mit 95%iger Wahrscheinlichkeit zutrifft.

### 2.17 Screeningbedingungen

Um die durch das Aktivierungstaging veränderten Pflanzen zu detektieren, wurden Screenings durchgeführt. Zum einen wurde nach toleranten Phänotypen gegenüber Salz, Abscisinsäure und 2,4-D gesucht. Zum anderen wurde nach morphologischen Auffälligkeiten bei Keimlingen in Erdkultur und auf Kulturmedium geschaut.

Für alle Screenings auf Kulturmedium wurden Tabaksamen der Linien ADL und ADW

verwendet (Abschnitt 2.10.4). Es wurden die in Tabelle 2.12 aufgelisteten Medien verwendet.

Screening	Medium
Morphologisch auffällige Keimlinge	MS
Salztoleranz	MS+160mM NaCl
Abscisinsäure-Toleranz	MS+1 $\mu$ M ABA
2,4-D Toleranz	MS+2 $\mu$ M 2,4-D

*Tabelle 2.12: Medium für die durchgeführten Screenings*

Als Wachstumskontrolle wurden jeweils Wildtyp SRI-Pflanzen auf MS-Medium ohne Zusatz ausgebracht. Pro Platte wurden zwischen 100 und 200 Samen ausgesät und die Anzucht fand im Lichtschrank unter Langtagbedingungen (16h Tag/8h Nacht) statt. Der Beobachtungszeitraum betrug ca. 3 Wochen, bis die Wachstumskontrollen das 5-Blattstadium erreicht hatten.

Das Screening nach phänotypisch auffälligen Keimlingen in Erde wurde von Corinna Streitner im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt (Streitner 2003). In die mit handelsüblicher Blumenerde befüllten Pflanzschalen mit den Maßen 27x45cm wurden jeweils ca. 10000 Samen ausgesät. Dazu wurden die Samen zuvor abgewogen, wobei 75mg ca. 1000 Samen entsprechen, mit Sand (Korngröße ca. 1,5mm) gemischt und mit einem Salzstreuer gleichmäßig auf der befeuchteten Blumenerde verteilt. Die Anzucht erfolgte im Gewächshaus, wobei die Kästen bis zur Keimung der Samen mit Folie abgedeckt wurden. Nach 14-tägigem Wachstum wurden die phänotypisch auffälligen Pflanzen mit einem Zahnstocher markiert und umliegende normal aussehende Keimlinge im Bereich von 2-3cm mit einer Pinzette entfernt. Nach 3 Wochen wurden die verbliebenen Pflanzen erneut gesichtet. Nach 5 Wochen wurden die markierten Pflanzen entweder direkt für die RNA-Isolierung eingesetzt, wenn kein weiteres Wachstum zu erkennen war oder für weiteres Wachstum in Einzeltöpfe umgepflanzt.

## 2.18 DNA-Extraktion aus Pflanzen

### 2.18.1 DNA-Extraktion aus Zuckerrüben *hairy roots*

Die genomische DNA aus *hairy roots* wurde mit Hilfe des REExtract-N-Amp™ Plant PCR Kits (Sigma Aldrich) durchgeführt. Dazu wurde ein 4-5cm langer Wurzelstrang von der Pflanzplatte entnommen und in ein 2ml Mikroreagiergefäß überführt. Die nachfolgenden Extraktions- und Aufreinigungsschritte wurden analog dem Protokoll des REExtract-N-Amp™ Plant PCR Kits durchgeführt. Das Flüssigkeitsvolumen am Ende der DNA-Extraktion betrug 100µl.

### 2.18.2 DNA-Isolierung aus Blattmaterial von Zuckerrübenpflanzen

Für die jeweilige Überprüfung der erhaltenen Pflanzen mittels PCR auf das Vorhandensein und die Integration von *Ac*, *Ds* und der *donor site* sowie eines möglicherweise zirkulären *Ac*-Elements wurde die chromosomale DNA nach einem modifizierten Protokoll aus einer Dissertation von Uphoff 1994 aus den Blättern der Zuckerrübe isoliert.

Dazu werden zunächst fünf Scheiben Blattmaterial mit dem Deckel eines 1,5ml Reaktionsgefäßes ausgestanzt (ca. 100 mg) und in flüssigem Stickstoff mittels Mikropistill gemörsert. Der weitere Zellaufschluss erfolgt nach Zugabe von 500µl 2xCTAB-Extraktionspuffer (+10µl/ml 2-Mercaptoethanol) und 4µl RNase (c~5mg/ml) durch Vortexen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 65°C wird zehn Minuten bei 12000g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wird 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und das Gefäß zum Mischen mehrmals auf den Kopf gedreht. Nach erfolgter Phasentrennung durch einminütige Zentrifugation bei 11000g wird erneut der Überstand abgenommen und mit 0,1 Volumen Na-Acetat Lösung sowie 1 Volumen Isopropanol gemischt (mehrmals auf den Kopf drehen). Die DNA wird für 60 Minuten bei 4°C gefällt und anschließend durch 1 5-minütige Zentrifugation bei 15000g in der Kühlzentrifuge (4°C) pelletiert. Der Überstand wird abgekippt, das Pellet mit 1ml 70% Ethanol gewaschen und anschließend für ca. 5 Minuten an der Luft getrocknet. Schließlich erfolgt die Aufnahme des DNA-Pellets in 50µl LTE-Puffer.

Die DNA-Extraktion für die IPCR fand mit dem NucleoSpin® Plant II-Kits (Macherey&Nagel) nach Angaben des Herstellerprotokolls statt, wobei in Schritt 8 zweimal in jeweils 50µl (insgesamt 100µl) Puffer PE eluiert wurde.



### 2.18.3 DNA-Isolierung aus Blattmaterial von Tabakpflanzen

Für die jeweilige Überprüfung mittels PCR der transformierten Pflanzen auf das Vorhandensein von *Ac*, *Ds* und der *empty donor site* wurde DNA mit dem NucleoSpin® Plant II-Kit (Macherey&Nagel) isoliert. Es wurden ca. 100mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert. Im letzten Schritt wurde mit 100µl Puffer PE eluiert.

### 2.19 RNA-Isolierung aus Pflanzen

Die Isolierung von Gesamt RNA wurde mit dem NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey&Nagel) nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Es wurden bei der RNA-Isolierung aus Blattmaterial von adulten Pflanzen ca. 100mg eingesetzt. Bei der RNA-Isolierung aus Keimlingen wurde die gesamte Pflanze von ca. 30mg verarbeitet. Die Gesamt-RNA wurde in einem Volumen von 60µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.20 Reverse Transkription (RT-Reaktion)

Für die Reverse Transkription wurden maximal 11µl isolierte Gesamt-RNA (ca. 400ng) eingesetzt (Abschnitt 2.19). Die Menge der eingesetzten RNA variierte zwischen den Proben und wurde nach Konzentrationsabschätzung auf einem Testgel angeglichen. Die Reaktion erfolgte mit Komponenten aus dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas) nach den Angaben des Herstellerprotokolls.

### 2.21 Agarosegel-Elektrophorese

Die Gele wurden mit einem 0,9 bis 1,2%igen Anteil (w/v) an Agarose in 1xTAE-Elektrophoresepuffer hergestellt. Nach Erhitzen in der Mikrowelle und anschließendem Abkühlen im Wasserbad auf etwa 60°C wurde 1/10000 Volumen Ethidiumbromid-Lösung zugesetzt und in Gelträger gegossen. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von mindestens 10µl gebracht und entweder mit 1µl 10xLadepuffer oder 2µl DNA Loading Dye (MBI Fermentas) vermischt. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 6-8V pro cm.

### 2.22 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA im Agarosegel wurde die zu gewinnende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und je nach Größe in ein 15ml Sarstedt Röhrchen oder ein 2ml Mikroreagiergefäß überführt. Die nachfolgende Aufreinigung wurde analog dem Protokoll des NucleoSpin®Extract Kits mit nachstehenden Abänderungen durchgeführt. Der optionale Waschschrift (Schritt 5) wurde beibehalten. Gerätetechnisch bedingt wurde in Schritt 5,6,7 und 8 mit 13000rpm anstatt mit 14000rpm zentrifugiert.

### 2.23 Restriktionsspaltungen

Spaltungen mit den Restriktionsenzymen wurden in einem Volumen von 10 oder 20µl jeweils mit dem vom Hersteller angegebenen optimalen Puffer und bei optimaler Temperatur durchgeführt (meist 37°C). Für je 1µg DNA wurde eine Enzymmenge von 2units zugegeben und mindestens zwei Stunden gespalten. Bei einigen Spaltungen wurden zusätzlich noch 1/10 Volumen RNase (c=1µg/µl) zugesetzt, wenn in den vorangegangenen Aufreinigungsschritten die RNA nicht abgetrennt oder zerschnitten wurde.

### 2.24 Auffüllen von sticky ends

Nach einer Restriktionsspaltung wurden teilweise die überhängenden DNA-Enden partiell oder vollständig mit Nukleotiden aufgefüllt, um eine Ligation mit Fragmenten, die nicht mit dem selben Enzym geschnitten wurden, zu ermöglichen. Hierzu wurde das Klenow Fragment der DNA-Polymerase I eingesetzt, welches zur Polymerisation fähig ist, jedoch keine 5'→3' Exonuklease-Aktivität mehr besitzt. Auf diese Weise werden die überstehenden 5'-Termini nicht abgebaut.

Im Reaktionsansatz waren folgende Komponenten enthalten: 1/5 Volumen 5xReaction Buffer (vom Hersteller mitgeliefert), dNTP-Mix beziehungsweise entsprechend ausgewählte dNTPs in einer Endkonzentration von 40µmol, 1 unit Klenow Fragment pro 1µg DNA. Das Gesamtvolumen der Reaktionsansätze variierte je nach Konzentration und Menge der vorliegenden DNA-Probe und betrug 20µl, 50µl oder 100µl. Es wurden zwischen 100ng und 2,6µg DNA, stammend aus der Restriktionsspaltung, eingesetzt. Das

Volumen der verdauten DNA nahm hierbei nicht mehr als 50% des gesamten Reaktionsmix ein.

### 2.25 Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden

Um die Religation der geschnittenen Enden eines Vektor zu unterdrücken und so die Ligationseffizienz zwischen Vektor und einem Fragment zu erhöhen, wurden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert. Hierzu wurde folgender Ansatz gewählt:

20µl DNA (aus Restriktions-/Auffüllreaktion; 0,1 bis ca. 3µg)	
5µl 10xReaction Buffer (MBI Fermentas)	
1µl Alkaline Phosphatase (1unit/µl)	
14µl dH <sub>2</sub> O	
<hr/>	
40µl	

Der Ansatz wurde 60min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10min bei 75°C inaktiviert. Vor der Ligation wurde die DNA aufgereinigt. Der Ansatz wurde mit dH<sub>2</sub>O auf 200µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 20µl Na-Acetat Lösung und 200µl Phenol/Chloroform (1:1) wurde kurz gemischt. Um die Trennung der wässrigen und organischen Phase zu beschleunigen, wurde für 2min mit 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Gefäß mit 1 Volumen Chloroform gut vermischt und erneut für 2min mit 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Gefäß mit der zweifachen Menge Ethanol (98%) vermischt. Die Fällung der DNA erfolgte bei -20°C für mindestens 30min. Anschließend wurde für 15min mit 13000rpm und bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet war, wurde es im gewünschten Volumen LTE (meist 20µl) aufgenommen.

### 2.26 Ligation von Inserts und Vektoren

Zwischen 50ng und 400ng (bevorzugt dephosphorylierte) Vektor-DNA wurde in einem Volumen von maximal 10µl mit der dreifach-molaren Menge an Insert-DNA gemischt. Bei Ligation von *sticky ends* wurden 2µl 10xLigation Buffer (MBI Fermentas) und 2units T4 DNA Ligase eingesetzt. Bei *blunt end* Ligationen wurde die doppelte Enzymmenge eingesetzt, also 4units, und zusätzlich 2µl PEG4000 Lösung. Die Ansätze wurden mit dH<sub>2</sub>O jeweils auf ein Volumen von 20µl gebracht. Das Enzym wurde jeweils als Letztes in den Ansatz pipettiert.

Für die Zirkularisierung von linearer DNA wurde 25-50ng lineare DNA in einem Volumen von 10-35µl eingesetzt. Im Ansatz waren 5µl 10xLigation Buffer, 5µl PEG4000 Lösung und 4units T4 DNA Ligase enthalten. Der Ansatz wurde mit dH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50µl ergänzt. Auch hier wurde die Ligase als Letztes hinzugefügt.

Die Inkubation aller Ansätze erfolgte im Wasserbad für 60min bei 22°C oder über Nacht bei 11°C. Die Reaktion wurde durch Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 10min abgestoppt.

### 2.27 DNA-Fällung

Um die DNA-Konzentration in einem Ansatz zu erhöhen, oder die DNA in ein anderes Lösungsmittel zu überführen, wurde der Ansatz mit 1/10 Volumen Na-Acetat Lösung und 2,5 Volumen 100%igem Ethanol vermischt und 30min bei –20°C gefällt. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 4°C und mit 17000rpm wurde der Überstand abgegossen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 10min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet und schließlich in dH<sub>2</sub>O oder LTE aufgenommen.

Für die DNA-Fällung und zur Abtrennung von Triphosphaten nach der Auffüllreaktion von *sticky ends* wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen NH<sub>4</sub>-Acetat (4M) und 2 Volumen kaltem 100%igem Ethanol vermischt und 30min bei –20°C gefällt. Es wurde für 6min bei Raumtemperatur mit 15500rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das getrocknete Pellet in LTE gelöst und der Fällungsschritt wiederholt. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und für 5min mit 17000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet getrocknet und in LTE oder dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.28 Transformation mittels Hitzeschock

In einem 2ml-Mikroreagiergefäß wurden 50µl kompetente *E. coli*-Zellen und 10µl des Ligationsansatzes vorsichtig mit der Pipettenspitze vermischt. Der Ansatz wurde für 20min auf Eis gestellt. Der Hitzeschock erfolgte im 42°C temperierten Wasserbad für genau 90sec. Der Ansatz wurde sofort nach dem Hitzeschock für 1-2min auf Eis gelagert. Es wurden 200µl SOC-Medium zugefügt und bei 37°C für 60min unter Schütteln inkubiert. Vom Transformationsansatz wurden 10µl, 50µl und 100µl auf Platten mit LB-Medium und entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus den entstandenen Kolonien wurden Plasmidminipräparate erstellt und anschließend Testspaltungen durchgeführt.

### 2.29 Herstellung kompetenter Zellen für die Hitzeschocktransformation

Es wurden 2ml SOB-Medium mit 5µl einer Glycerinkultur von XL1blue-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 500µl mit 50ml SOB-Medium verdünnt (1:100) und bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine Optische Dichte von  $OD_{550}=0,3$  erreicht hat. Die gesamte Kultur wurde in 100ml vorgewärmtes SOB-Medium überführt und bis zu einer Dichte von  $OD_{550}=0,5$  wachsen gelassen. Die Bakteriensuspension wurde auf 4 sterile Zentrifugenröhrchen verteilt und für 5min mit 4000rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet jeweils in 7,5ml kaltem TFB I-Puffer vorsichtig resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen und Abgießen des Überstandes wurde das Pellet jeweils in 1ml TFB II-Puffer vorsichtig resuspendiert und die Zellsuspension der 4 Röhrchen vereint. Je 200µl wurden in 2ml-Mikroreagiergefäße aliquotiert. Diese wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.30 Elektrotransformation

Die Elektrotransformation ist bei Einbringen von großen Plasmidvektoren der Transformation mittels Hitzeschock vorzuziehen. Für die Elektroporation der Zellen kam

der Gene Pulser® II der Firma Bio-Rad zum Einsatz.

Für die Transformation mittels Elektroporation in kompetente Bakterienzellen musste der Ligationsansatz zuvor aufgereinigt werden. Dazu wurde der Ligationsansatz mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 100µl gebracht und mit 10µl Na-Acetat Lösung und 100µl Phenol/Chloroform versetzt, gemischt und 2min mit 15000rpm zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde in einem neuen Gefäß mit 100µl Chloroform gemischt und nochmal zentrifugiert. Jetzt wurde der wäßrige Überstand in einem neuen Gefäß mit 200µl kaltem Ethanol (98%) gemischt und 30min bei –20°C g efällt. Danach wurde 30min bei 4°C mit 17000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Auf diese Weise wurde die Probe möglichst salzfrei gemacht. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde jeweils 10min bei 4°C mit 17000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 15µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

In 50µl kompetent gemachte *E. coli*- beziehungsweise *A. tumefaciens*-Zellen wurden 2-5µl ligierte und aufgereinigte DNA (max. 5ng) vorsichtig mit der Pipettenspitze eingerührt und 5min auf Eis inkubiert. Die Zellen mit Plasmid-DNA wurden in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert, welche in die Apparatur eingesetzt wurde. Es wurden folgende Parameter gewählt: Spannung 2500 Volt, Kapazität 25µF, Vorwiderstand 200Ω (bei *A. tumefaciens* 400Ω). Der ausgelöste Impuls sollte zwischen 4,9 und 5,2 Millisekunden dauern. Direkt nach dem Impuls wurde 1ml SOC-Medium in die Küvette gegeben und der gesamte Mix mit einer Pasteurpipette in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt. Die Inkubationsdauer für *E. coli*-Zellen betrug 60min bei 37°C, für Agrobakterium-Zellen 60-90min bei 30°C. Es wurden 1 µl, 10µl und 100µl der Zellen auf Medium mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und unter jeweils optimaler Temperatur über Nacht wachsen gelassen. Bei Agrobakterium wurde die Inkubationszeit häufig um 24 Stunden erweitert, bis ausreichend große Kolonien gepickt und weiterbearbeitet werden konnten.

### 2.31 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektrotransformation

Es wurden 5ml dYT-Medium mit 5µl Glycerinkultur von XL1blue *E. coli*-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Diese Vorkultur wurde in einen 1000ml Erlenmeyerkolben mit 500ml dYT-Medium überführt und erneut bei 37°C auf dem

Schüttler inkubiert, bis die Zelldichte  $OD_{600}=0,5-0,8$  betrug (ca. 2,5 Stunden). Um die weitere Zellproliferation zu minimieren, wurde der Kolben 30min auf Eis gelagert und bei den nachfolgenden Schritten kühl gehalten. Anschließend wurde die Zellsuspension in einen 500ml-Zentrifugenbecher überführt und in der Sorvall-Zentrifuge mit 5000rpm bei 4°C pelletiert. Das Medium wurde möglichst quantitativ entfernt und das Pellet in 500ml kaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation wurde das verbleibende Pellet in 250ml kaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei das Pellet in 10ml und schließlich in 1ml resuspendiert wurde. Die Zellen wurden zu je 50µl in Mikroreagiergefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Eisschrank bei –80°C gelagert.

### 2.32 Herstellung kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen für die Elektrotransformation

Die Herstellung der für die Elektroporation kompetent gemachten Zellen erfolgte nach einem Protokoll von Nagel *et al.* (1990). Es wurde der Agrobakterium-Stamm C58C1 mit dem residenten Plasmid pGV2260 verwendet.

Es wurden 5ml LB/Carb/Rif-Medium mit 5µl Glycerinkultur der Agrobakterien-Zellen angeimpft und über Nacht bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 250ml LB/Carb/Rif-Medium überführt und bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert, bis die Zelldichte  $OD_{600}=0,4-0,8$  betrug. Die Zellsuspension wurde dann 10min auf Eis gestellt und anschließend 15min mit 4000g und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 250ml eiskaltem HEPES-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Pellet in 125ml HEPES aufgenommen. Nach dem nächsten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 100ml 10%iger Glycerinlösung (v/v) und schließlich nach nochmaliger Zentrifugation in 750µl 10%iger Glycerinlösung aufgenommen. Es wurden je 50µl in Mikroreagiergefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

### 2.33 Plasmidminipräparation

Dieses Verfahren basiert auf der Methode der Alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979). Aus der über Nacht in LB-Medium (mit entsprechenden Antibiotika) angereicherten

Bakteriensuspension wurden 1,5ml in ein Mikroreagiergefäß gegeben und die Zellen für 40sec bei 13000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und der Vorgang wiederholt. Das Bakterienpellet wurde in 100µl eiskaltem Zellsuspensionspuffer resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte dann durch Zugabe von 200µl Denaturierungslösung. Das Vermischen der Lösung wurde durch drei- bis viermaliges Invertieren der Gefäße herbeigeführt. Nach Inkubation für 5min auf Eis wurde 150µl Renaturierungslösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und erneut für 5min auf Eis gelagert. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 20min bei 13000rpm und Raumtemperatur an. In einem neuen Gefäß wurde der Überstand mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform vermischt. Nach zweiminütiger Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase in einem neuen Gefäß mit dem zweifachen Volumen Ethanol gefällt. Anschließend wurde für 5min bei 13000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Trocknen des Pellets wurde das Gefäß über Kopf auf Zellstoffpapier gestellt, bis kein Alkoholgeruch mehr festzustellen war. Das DNA-Pellet wurde in 20µl LTE-Puffer aufgenommen.

### **2.34 Plasmidmidipräparation**

Diese Plasmidpräparation wurde mit Hilfe des Nucleobond® AX 100 Kits (Macherey& Nagel) und nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Es wurde 35ml einer Bakteriensuspension eingesetzt. Diese stammt aus einer über Nacht in einem 250ml-Erlenmeyerkolben mit 50ml LB-Medium (mit entsprechenden Antibiotika) angezogenen Bakterienkolonie. Das laut Protokoll unter Schritt 4 durchzuführende Aufklaren des Bakterienlysats vom SDS-Präzipitat erfolgte durch einmaliges Filtrieren mit einem Faltenfilter. Im letzten Schritt wurde das DNA-Pellet in 150µl LTE resuspendiert.

### **2.35 Plasmidmaxipräparation**

Diese Plasmidpräparation wurde mit Hilfe des Nucleobond® AX 500 Kits (Macherey& Nagel) und nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Für die Vorkultur wurde eine Bakterienkolonie mit dem Zahnstocher gepickt und in 5ml LB-Medium (mit entsprechenden Antibiotika) überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht auf dem Schüttler bei 37°C. Von der Vorkultur wurden 100µl in einem 1000ml-Erlenmeyerkolben



mit 200ml LB-Medium (mit entsprechenden Antibiotika) überimpft und über Nacht auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Für die Plasmidmaxipr äparation wurden 150ml dieser Bakteriensuspension eingesetzt. Das laut Protokoll unter Schritt 4 durchzuführende Aufklaren des Bakterienlysats vom SDS-Präzipitat erfolgte durch einmaliges Filtrieren mit einem Faltenfilter. Im letzten Schritt wurde das DNA-Pellet in 300µl LTE resuspendiert.

### 2.36 Herstellung von Glycerindauerkulturen

In einem 1,5ml-Mikroreagiergefäß wurde zu 300µl Glycerin, 700µl Bakteriensuspension aus einer frischen LB-Flüssigkultur (mit entsprechenden Antibiotika) gegeben, die über Nacht mit einem gepickten Klon angereichert worden war. Die Dauerkultur wurde kurz gemischt und bei -80°C eingefroren.

### 2.37 Sequenzierungen und Auswertung

Die Sequenzierungen sind extern bei den Firmen Seqlab GmbH (Göttingen) sowie GATC Biotech AG (Konstanz) in Auftrag gegeben worden. Die zu sequenzierenden PCR-Fragmente oder die Plasmid-DNA und der jeweils zu verwendende Sequenzierungsprimer wurde nach Angaben des Dienstleisters vorbereitet und versandt. Die Sequenzauswertungen erfolgten mit der Software 'Bioedit Sequence Alignment Editor' (Version 5.0.9; Hall 1999). Nach Sequenzhomologien zu bekannten Genen in Datenbanken wurde mit dem Programm BLAST gesucht (Altschul *et al.* 1997; URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi> [Stand Oktober 2008]).

### 2.38 PCR (*empty donor site*, *Ds*, *Ac*, *bar*)

Das REDExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit, mit dem die DNA aus *hairy roots* isoliert wurde, beinhaltet auch Komponenten für die PCR-Reaktion, die auf die DNA-Extraktionslösung abgestimmt sind. Die verwendeten Primer-Stammlösungen wurden 1:10 verdünnt und es wurde jeweils 1µl der Verdünnungen eingesetzt.

Für alle übrigen PCRs wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

2µl DNA *template*  
17,1µl dH<sub>2</sub>O  
2,5µl PCR-Puffer (10x)  
0,75µl MgCl<sub>2</sub> (25mM)  
0,5µl dNTP-Mix (10mM)  
1µl *Upper* Primer (1:5 verdünnt; =20pmol)  
1µl *Lower* Primer (1:5 verdünnt; =20pmol)  
0,15µl Taq DNA-Polymerase (5units/µl)

---

25µl

Für das PCR-Programm wurden folgende Parameter gewählt:

3min bei 94°C  
32 Zyklen    1min bei 94°C  
                  1min bei 50°C bis 60°C (angepasst an die T<sub>m</sub> der eingesetzten Primer)  
                  2min bei 72°C  
10min bei 72°C  
xmin bei 4°C

### 2.39 Semiquantitative Multiplex-PCR

Als *template* diente cDNA aus der RT-Reaktion von RNA aus *Arabidopsis thaliana*. Es wurde nachstehender PCR-Ansatz verwendet:

2µl cDNA  
26,1µl dH<sub>2</sub>O  
4µl PCR-Puffer (10x)  
1,5µl MgCl<sub>2</sub> (25mM)  
2µl dNTP-Mix (10mM)  
1µl Ac1710 (1:5 verdünnt; =20pmol)  
1µl Ac2419< (1:5 verdünnt; =20pmol)  
1µl dhfr8 (1:5 verdünnt; =20pmol)  
1µl dhfr522< (1:5 verdünnt; =20pmol)  
0,1µl gapC\_L (1:5 verdünnt; =2pmol)  
0,1µl gapC\_R (1:5 verdünnt; =2pmol)  
0,2µl Taq DNA-Polymerase (5units/µl)

---

40µl

Das PCR-Programm im Eppendorf Mastercycler hatte folgenden Verlauf:

3min bei 94°C  
\* Zyklen      30sec bei 94°C  
                 30sec bei 56°C  
                 90sec bei 70°C  
2min bei 70°C  
xmin bei 4°C

(\*Die Anzahl der Zyklen betrug zunächst 20, danach jeweils 5 Zyklen zwischen der Probenentnahme)

Nach 20, 25, 30 und 35 Zyklen wurden jeweils 5µl Probe aus der PCR-Reaktion entnommen und mit 1µl Loading Dye versetzt und im Kühlschrank gelagert bis alle Proben gewonnen wurden. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte anschließend auf einem 1%igem Agarosegel.

### 2.40 IPCR

Die Inverse-PCR (IPCR) eignet sich zur Untersuchung von unbekannter DNA, in der sich ein Fragment mit bekannter Sequenz befindet. Die Methode wurde von Triglia *et al.* (1988) beschrieben und von Earp *et al.* (1990) speziell für die Amplifikation von Transposon-flankierender DNA angewandt.

Die DNA wird zunächst mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen geschnitten. Die Schnitte dürfen nicht im Bereich zwischen den ausgewählten Primern im bekannten Fragment erfolgen. Die erhaltenen Fragmente werden unter Bedingungen, die eine Zirkularisierung begünstigen, religiert. Es werden Primer homolog zur bekannten Sequenz konzipiert, die so ausgelegt sind, dass die 3'-Enden nach außen orientiert sind. Mit diesen Primern wird eine PCR durchgeführt. Auf diese Weise wird die DNA beidseitig der Fragmentenden bis zur Schnittstelle amplifiziert.

Versuchsdurchführung:

Die IPCR wurde für die Untersuchung der Integration des *Ac/Ds*-Transposons im Pflanzengenom genutzt.

Es wurde genomische DNA aus *hairy roots* bzw. Zuckerrübenblättern verwendet.

Für die Restriktionsspaltung wurde folgender Ansatz verwendet:

49µl DNA (≈400-800ng)
10µl 10xPuffer (MBI Fermentas)
1µl Restriktionsenzym (MBI Fermentas, 10units/µl)
40µl dH <sub>2</sub> O
<hr/>
100µl

Die Spaltung wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt. Zur Inaktivierung und Abtrennung des Enzyms kam das QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN) zum Einsatz. Der Erfolg der Restriktionsspaltung wurde mit einem Testgel ermittelt.

Für die Ligation wurde folgender Ansatz verwendet:

39,5µl aufgereinigte Probe
5µl 10x Ligase Buffer (Stratagene)
5µl 10mM rATP (pH 7,5)
0,5µl T4 DNA Ligase (Stratagene, 4units/µl)
<hr/>
50µl

Nach der Ligation über Nacht bei 4°C wurde das Enzym für 20min bei 65°C inaktiviert.

Für die PCR-Reaktion wurden verschiedene Primerkombinationen verwendet:

I(Ds1)-137 & I(Ds2)212< für Zuckerrüben; 568(L30) & 1087(U26) für *hairy roots*

Es wurde nachstehender PCR-Ansatz verwendet:

5µl DNA aus Ligation
15,3µl dH <sub>2</sub> O
2,5µl 10x Linkage Buffer
1µl Lower Primer (1:5 verdünnt; =20pmol)
1µl Upper Primer (1:5 verdünnt; =20pmol)
0,2µl Taq DNA-Polymerase (5units/µl)
<hr/>
25µl

Das IPCR-Programm hat folgenden Verlauf:

4min bei 95°C  
30 Zyklen    30sec bei 95°C  
              30sec bei 60°C  
              2min bei 72°C  
10min bei 72°C  
xmin bei 4°C

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte wurden 9µl aus dem Ansatz mit 1µl 10xLadepuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Für das präparative Gel zur Isolierung der Fragmente wurden 15µl aus dem Ansatz mit 2µl 10xLadepuffer versetzt und aufgetrennt.

Für die Reamplifikation wurde 1µl aus dem Ansatz der vorangegangenen PCR 1:500 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurde 1µl für die PCR eingesetzt. Die oben aufgelisteten Komponenten für den Reaktionsmix sowie das Programm blieben unverändert, die Menge an dH<sub>2</sub>O im Ansatz wurde jedoch um 4µl erhöht, um wieder auf ein Gesamtvolumen von 25µl zu gelangen. Für die Reamplifikation wurden die Primerpaare I(Ds1)-108 & I(Ds2)94< für Proben aus transgenen Zuckerrüben bzw. 469(L20) & 1099(U21) für Proben aus *hairy roots* verwendet.

### 2.41 Klonierung der PCR-Fragmente

Zur Klonierung wurden entweder die PCR-Produkte nach Fällung zur Abtrennung der Oligonukleotide und der dNTPs direkt eingesetzt oder die Banden der zu analysierenden Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und dem NucleoSpin®Extract-Kit (Macherey&Nagel) aufgereinigt. Anschließend wurden diese, dem Protokoll des TA Cloning® Kits der Firma Invitrogen folgend, in den Vektor pCR2.1 ligiert und in INVαF' Zellen transformiert. Für die Blau/Weiß-Selektion wurden je 50µl und 200µl auf LB/Carb/X-Gal-Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur eindeutigeren Farbentwicklung wurden die Platten nach der Inkubation für 3h bei 4°C gelagert. Weiße, potentiell ein Insert tragende Kolonien wurden mit einem Zahnstocher gepickt und in 3ml LB/Carb-Medium überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C schloss sich entweder die Plasmidminipräparation mit anschließendem Restriktionsenzymverdau oder eine Plasmidmidipräparation mit nachfolgender Sequenzierung an.

### 2.42 GUS-Assay

Das Gen *uidA* der  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) diene als Reportergen für die Expressionsstärke im Blattgewebe der untersuchten Tabakpflanzen. Die  $\beta$ -Glucuronidase katalysiert die Umwandlung des Substrats 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid (4-MUG) in 4-Methylumbelliferon (4-MU), dessen Konzentration fluorimetrisch bestimmt werden kann. Die Umsatzrate ist proportional zur vorhandenen Enzymkonzentration und damit ein Maß für die GUS-Expressionsstärke im untersuchten Gewebe.

Zur Bestimmung der GUS-Aktivität nach Jefferson *et al.* (1987) wurden ca. 60mg des zu untersuchenden Pflanzengewebes mit einem Mikropistill in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das gemahlene Gewebe wurde in 200 $\mu$ l Proteinextraktionspuffer aufgenommen und 10min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und erneut für 10min zentrifugiert. Der abermals überführte Überstand enthält den Proteinextrakt, der für die GUS-Reaktion und die Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt wurde.

Für die GUS-Reaktion wurden 50 $\mu$ l vom Proteinextrakt in 450 $\mu$ l GUS-Reaktionspuffer gegeben, der auf 37°C in einem Thermoblock vorgewärmt worden war. Aus dem Reaktionsansatz wurden nach 1, 15, 30 und 45min jeweils 50 $\mu$ l entnommen und mit 950 $\mu$ l GUS-Stopplösung (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) versetzt. Die Bestimmung des gebildeten Produktes erfolgte über Fluoreszenzanregung im Spektralphotometer (Exzitation: 365nm, Emission: 460nm). Dabei entsprachen 300 Fluoreszenzeinheiten (FU) einer 4-MU Konzentration von 10nM. Aus den gemessenen Fluoreszenzwerten FU wurde über eine Regressionsgerade die Umsatzrate FU/s bestimmt und in die Einheit pmol 4-MU $\cdot$ min<sup>-1</sup> $\cdot$ ml<sup>-1</sup> umgerechnet.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976). Es wurden 5 $\mu$ l des Proteinextraktes mit 995 $\mu$ l Bradford-Lösung gemischt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Absorption bei 595nm gemessen und über eine Eichgerade die Proteinkonzentration der Probe in mg $\cdot$ ml<sup>-1</sup> bestimmt. Die Eichgerade wurde durch Messung von unterschiedlichen Konzentrationen von Rinder-Serum-Albumin (BSA) erstellt.

Der GUS-Wert (pmol4-MU $\cdot$ min<sup>-1</sup> $\cdot$ mg<sup>-1</sup>) ergibt sich aus Division der Umsatzrate und der Proteinkonzentration der Probe.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zur Transposition von Mais *Ac/Ds* in der Zuckerrübe

##### 3.1.1 Exzision von *Ac* und *Ds* in der Zuckerrübe

Um die Markergeneliminierung mit dem aus Mais stammenden *Ac/Ds*-Transposonsystem durchführen zu können, muss die *Ac* vermittelte Transposition in der heterologen Wirtspflanze stattfinden. Bisher wurde dies für die Zuckerrübe noch nicht gezeigt. Für die Untersuchungen wurden *Ac* und *Ds* Elemente in Zuckerrüben transformiert. Ein erfolgreiches Transpositionereignis lässt sich in die beiden Schritte Exzision und Integration unterteilen, die getrennt analysiert werden, da häufig die Exzision der Transposonelemente ohne anschließende Integration abläuft. Ein erster Hinweis über die Exzision wird durch die Selektion der Pflanzen auf Medium mit Phosphinothricin (Ppt) erhalten. In den für die Pflanzentransformation verwendeten T-DNA Konstrukten (Abschnitt 2.9, Seite 30) ist das Transposon zwischen 35S-Promotor und kodierender Sequenz der Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT), die durch das *bar*-Gen kodiert ist, positioniert, so dass nach Exzision die PAT exprimiert wird und der Pflanze Resistenz gegenüber Ppt vermittelt.

Bei ersten Transformationsexperimenten wurden Zuckerrüben-Petiolen mit verschiedenen *Ac* und *Ds* enthaltenden T-DNA Konstrukten transformiert. Es erfolgte eine Kotransformation mit *A. rhizogenes*, wodurch es zur Ausbildung von *hairy roots* kam (Abschnitt 2.10.1, Seite 37). Diese wurden geschnitten und auf Medium mit Ppt umgesetzt, um auf Exzisionereignisse zu selektieren. Nach mehreren Selektionsschritten wurde aus dem Wurzelmaterial DNA isoliert und mittels PCR die *donor site* amplifiziert.

Bei späteren Transformationen ohne *A. rhizogenes* wurden komplette Pflanzen unter Selektionsdruck regeneriert (Abschnitt 2.10.2, Seite 38 und Abschnitt 2.12, Seite 42). Verschiedene Linien mit *Ac* und *Ds* wurden gekreuzt bzw. geselbstet und aus der Nachfolgegeneration wurde DNA für die PCR isoliert. Da diese Pflanzen direkt in Erde ohne Selektion angezogen wurden, wurde zusätzlich zur *empty donor site*, die Anwesenheit von *Ac*, *Ds* bzw. *bar*-Gen durch PCR ermittelt.

Die Abbildungen 3.1 bis 3.3 zeigen exemplarisch die PCR-Ergebnisse der Zuckerrübenpflanzen, für die im folgenden Abschnitt 3.1.2 die *footprints* analysiert wurden. Die Tabelle im Anhang 7.2 fasst die PCR-Ergebnisse für alle untersuchten Pflanzen der

Linien 001R und 002R zusammen.

Die Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch die PCR-Amplifikate der *empty donor site*, die mit den Primern 35S367 und bar1392< aus genomischer DNA der Zuckerrübenpflanzen 002R-16, 002R-18, 002R-23, 002R-31, 001R-8<sup>R</sup> und 001R-9<sup>R</sup> erhalten wurden (Abschnitt 2.10.2, Seite 38). Bei erfolgter Exzision von Ac hat das erwartete PCR-Amplifikat der *empty donor site* eine Länge von 242bp, wenn eine Exzision der Elemente, ohne *footprints* zu hinterlassen, stattgefunden hat. Als PCR-Kontrolle für die erfolgreiche Amplifikation der *donor site* ohne Transposonelement diente Plasmid-DNA mit 35S-*bar* (Abbildung 3.1, Spur 7). Die Amplifikatgröße aus der Kontrolle 35S-*bar* beträgt statt 242bp nur 224bp, da in diesem Konstrukt die für das Einklonieren verwendeten Adaptoren nicht enthalten sind (Spur 7). Für die sechs dargestellten Proben tritt ein PCR-Amplifikat von ca. 240bp auf, was der Größe der *empty donor site* entspricht und zeigt, dass hier die Exzision der Transposonelemente stattgefunden hat (Abbildung 3.1, Spur 1-6).

Von den 58 getesteten pflanzlichen Nachkommen der Kreuzungen 001R und 002R (Abschnitt 2.10.2, Seite 38), die in Erde angezogen wurden, wiesen 19 Pflanzen die *empty donor site* auf (Anhang 7.2). Die Ergebnisse für den Nachweis der *empty donor site* in den *hairy root* Linien sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Von den 10 getesteten Linien konnte in 7 die *empty donor site* amplifiziert werden.

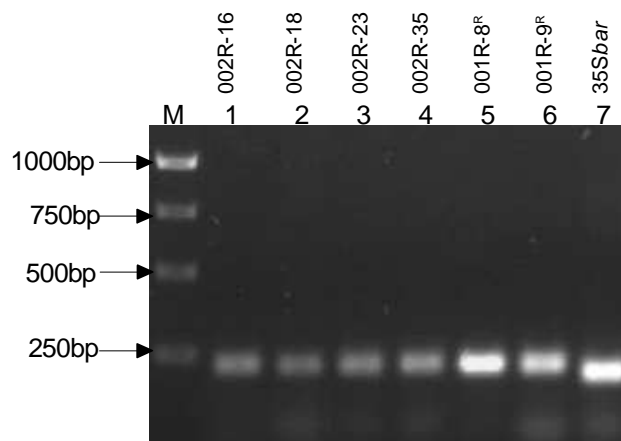


Abbildung 3.1: Gelfoto der PCR zum Nachweis der *empty donor site* in Zuckerrübenpflanzen. M:DNA GröÖenstandard.



### 3 Ergebnisse

Pflanzenlinie	Hr36-11	Hr36-15	Hr36-43	Hr36-48	Hr35-19	Hr35-22	Hr35-39	Hr35-43	Hr35-54	Hr35-66
<i>empty donor site</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+

Tabelle 3.1: PCR-Nachweis der *empty donor site* in den Linien der hairy root Transformanten. +:Amplifikat vorhanden; -:kein Amplifikat; Die Ergebnisse stammen aus der eigenen Diplomarbeit (Lisson 2002).

Die Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch die PCR-Ergebnisse für den Nachweis des *Ac*-Elementes. Die erwartete Amplifikatgröße von 576bp mit den Primern *Ac8* und *Ac9* wurde zur Kontrolle aus Plasmid-DNA *pUCAc9* erhalten (Abbildung 3.2, Spur 7). In 24 der 58 getesteten Zuckerrübenpflanzen konnte das *Ac*-Element nachgewiesen werden (Anhang 7.2). Für die Pflanzenproben 002R-18, 002R-35, 001R-8<sup>R</sup> und 001R-9<sup>R</sup> ist das erhaltene Amplifikat in Abbildung 3.2 gezeigt (Spur 2,4,5 und 6).

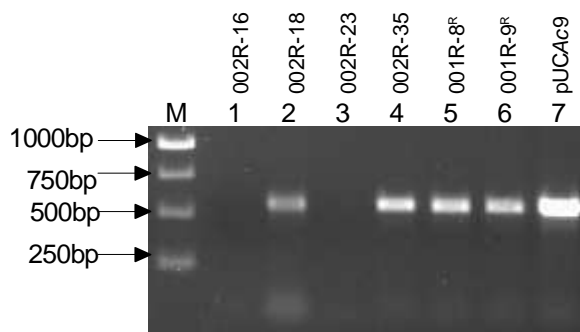


Abbildung 3.2: Gelfoto der PCR zum Nachweis von *Ac* in Zuckerrübenpflanzen. M:DNA Größenstandard.

Wie im Abschnitt 2.10.2 (Seite 38) erwähnt, enthielten einige Zuckerrübenlinien andere Elemente als angegeben. Deshalb wurde in den Linien 001R und 002R überprüft, in welchen Pflanzen zusätzlich zum *Ac* auch noch ein *Ds*-Element vorhanden ist. Die Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch die PCR-Ergebnisse für den Nachweis von *Ds*-Elementen mit den Primern *Ds751* und *Ds1153<*. Die erwartete Amplifikatgröße beträgt 403bp. Ein Fragment dieser Größe wurde in der Kontrolle erhalten, in der Plasmid-DNA mit *35Sbar::DspOp* als *template* eingesetzt wurde. In 15 der 58 Zuckerrübenpflanzen konnte die Anwesenheit von *Ds* durch ein vorhandenes Amplifikat gleicher Größe bestätigt werden (Anhang 7.2). Für die Proben 002R-16, 002R-18, 002R-23 und 002R-35 ist das Amplifikat in Abbildung 3.3 zu sehen (Spur 1 bis 4).

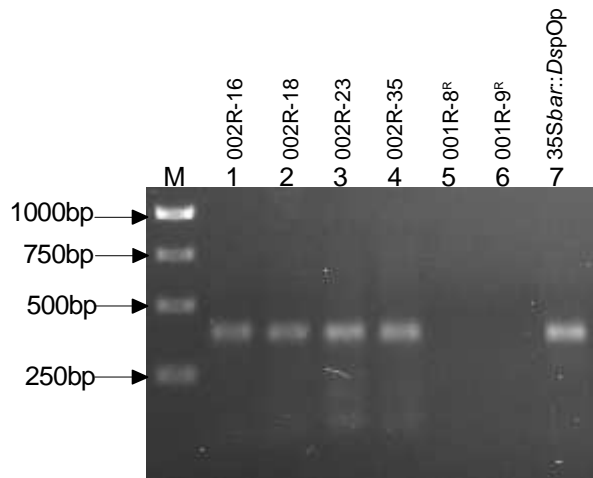


Abbildung 3.3: Gelfoto der PCR zum Nachweis von Ds in Zuckerrübenpflanzen. M:DNA Größenstandard.

Die Zuckerrübenpflanzen und *hairy root* Linien, bei denen die Exzision durch die PCR bestätigt wurde, wurden molekular weiter analysiert. Die PCR-Produkte der *empty donor site* wurden kloniert, um die *footprints* analysieren zu können (Abschnitt 3.1.2). Des Weiteren wurde eine IPCR durchgeführt, um die Integrationsstellen zu charakterisieren (Abschnitt 3.1.3). Für die IPCR wurden auch Zuckerrübenpflanzen mit einbezogen, bei denen die Anwesenheit von Ac bzw. Ds in der PCR bestätigt wurde, jedoch keine *empty donor site* gefunden wurde (Anhang 7.2).

#### 3.1.2 Sequenzveränderung an der Exzisionsstelle von Ac und Ds

Die molekulare Analyse und Bestätigung der erfolgten Exzision erfolgt durch die Klonierung und Sequenzierung der in der PCR gewonnenen Amplifikate der *empty donor site*. Vier Amplifikate der *hairy roots* und 6 der in Erde angezogenen Zuckerrübenpflanzen wurden erfolgreich kloniert und sequenziert. Die Sequenz wurde mit der Sequenz der rekonstruierten *empty donor site* verglichen, die entstehen würde, wenn das Ac bzw. Ds, ohne *footprints* zu hinterlassen, transponiert. Die *donor sites* von Ac- und Ds-Elementen können anhand der unterschiedlichen Adaptorsequenzen, die zur Erstellung der Konstrukte verwendet wurden, unterschieden werden. Bei den *hairy root* Linien ist die *donor site* des Ds-Elementes zu finden (Abbildung 3.4), bei den transgenen

Zuckerrübenpflanzen die *donor site* von *Ac* (Abbildung 3.5). An der Exzisionsstelle konnte in allen Proben ein *footprint* detektiert werden. Dieser erstreckt sich über 1-2 Nukleotide, wobei es immer zur Deletion eines Nukleotids kam und in 6 von 10 Fällen zur Veränderung eines zweiten Nukleotids. Ob die Veränderung *downstream* oder *upstream* von der Exzisionsstelle stattfand und ob es sich somit um eine Transition oder Transversion handelt, lässt sich nicht zurückverfolgen. In den Abbildungen 3.4 und 3.5 sind die Nukleotidveränderungen als Transversionen dargestellt, da dies am ehesten dem Modell des Exzisionsmechanismus entspricht (vergleiche Abschnitt 4.1.1, Seite 95).

Das Auftreten von *footprints* an der Exzisionsstelle ist ein charakteristisches Merkmal der *Ac/Ds* Transposition und bestätigt somit dieses Ereignis in den untersuchten *hairy roots* bzw. Blättern von Zuckerrübenpflanzen.

Bezeichnung	Sequenz der Exzisionsstelle
Rekonstruierte <i>empty donor site</i> von <i>Ds</i>	cgacgGATCAGCTTCGACA CGTCGAAGCTgatcc
Hr36-48	cgacgGATCAGCTTCGACA _GTCGAAGCTgatcc
Hr35-19	cgacgGATCAGCTTCGACT <u>T</u> _GTCGAAGCTgatcc
Hr35-43	cgacgGATCAGCTTCGAC_ CGTCGAAGCTgatcc
Hr35-66	cgacgGATCAGCTTCGAC_ CGTCGAAGCTgatcc

Abbildung 3.4: *Footprints* an der Exzisionsstelle von transponierten *Ds*-Elementen in *hairy roots*. Großbuchstaben: Sequenz der Adaptoren; Fett bzw. unterstrichen: Nukleotidveränderung im Vergleich zur rekonstruierten *empty donor site*; Die Daten stammen aus der eigenen Diplomarbeit (Lisson 2002).

Bezeichnung	Sequenz der Exzisionsstelle
Rekonstruierte <i>empty donor site</i> von <i>Ac</i>	cgacgGATCGACG TGTCgatcc
002R-16	cgacgGATCGAC_ <u>A</u> GTCgatcc
002R-18	cgacgGATCGACC _GTCgatcc
002R-23	cgacgGATCGACC _GTCgatcc
002R-35	cgacgGATCGACC _GTCgatcc
001R-8 <sup>R</sup>	cgacgGATCGACC _GTCgatcc
001R-9 <sup>R</sup>	cgacgGATCGACC _GTCgatcc

Abbildung 3.5: *Footprints* an der Exzisionsstelle von transponierten *Ac*-Elementen in Zuckerrübenpflanzen. Großbuchstaben: Sequenz der Adaptoren; Fett bzw. unterstrichen: Nukleotidveränderung im Vergleich zur rekonstruierten *empty donor site*. Die Daten von 002R-16/18/23/35 stammen aus einer Studienarbeit (Machens 2007), die von 001R-8<sup>R</sup>/9<sup>R</sup> aus einer Bachelorarbeit (Ringleb 2008).

### 3.1.3 Integrationsereignisse von *Ac* und *Ds* in der Zuckerrübe

Der Nachweis der Exzision der *Ac/Ds* Transposonelemente wurde durch das Auftreten der *footprints* bestätigt. Der Nachweis der Integration wird durch IPCR erbracht (Abschnitt 2.40, Seite 59). Für die IPCR Analyse wurden die *hairy root* Linien verwendet, bei denen die Exzision nachgewiesen wurde sowie Zuckerrübenpflanzen, die positiv auf die Anwesenheit von *Ac* bzw. *Ds* getestet wurden (Tabelle 3.1 und Daten im Anhang 7.2). Die klonierten und sequenzierten IPCR-Fragmente zeigen die genomische Sequenz des Integrationsortes 5' und 3' benachbart zu den *Ac*- bzw. *Ds*-Enden. Durch Zusammenfügen der 5' und 3' Teilabschnitte lässt sich der Integrationsort rekonstruieren. Durch Sequenzhomologievergleich in Datenbanken kann die Position der Integration charakterisiert werden, wenn homologe Sequenzen bereits vorhanden sind. Dann kann bestimmt werden, ob und in welchem Abschnitt eines Gens (Exon, Intron, UTR, etc.) die Integration stattgefunden hat oder ob sie in intergenischer Region erfolgt ist.

Anhand der IPCR-Sequenz kann auch die für die *Ac/Ds*-Transposition typische 8bp-Duplikation der *target site* nachgewiesen werden, die sich in den IPCR-Fragmenten direkt benachbart zu den Transposonenden wiederfinden müsste.

Es wurden insgesamt 13 IPCR-Fragmente erfolgreich kloniert und sequenziert. Bei sechs Fragmenten wurden zwischen den Transposonenden nur 1 bis 17 Nukleotide unbekannter Sequenz gefunden, die zu kurz sind, um sichere Aussagen über Homologien zu ermöglichen (Daten nicht gezeigt). Drei Fragmente zeigten unvollständige oder nur eines der beiden *Ac/Ds*-Enden oder enthielten benachbart zu den Transposonenden Sequenz-Artefakte der *donor site* (Daten nicht gezeigt). Vier Fragmente besaßen vollständige Transposonenden und dazwischenliegende Sequenz, die nicht aus der *donor site* stammt. In Abbildung 3.6 sind diese vier vollständigen IPCR-Fragmente schematisch gezeigt und Größe, Herkunft sowie gefundene Sequenzhomologien dargestellt. Die gesamten Sequenzen befinden sich im Anhang 7.1. Nur in einem Fragment konnte die Restriktionsschnittstelle, die aufgrund der IPCR-Methode auftreten sollte, wiedergefunden werden. (Doppelstrich im Fragment IPCR1R9, Abbildung 3.6). Das Fragment IPCR1R9 aus Pflanze 001R-9<sup>R</sup> besitzt eine 1444bp lange Sequenz zwischen den *Ac*-Enden, von denen 297bp eine 85%ige Homologie zum zweiten Intron des *cwiwit* Gens, einer Zellwandinvertase aus *Beta vulgaris* (Acc. No. AJ277458), aufweisen. Nur in diesem IPCR-Fragment wurde benachbart zur Integrationsstelle eine 8bp-Duplikation gefunden (Abbildung 3.6, türkis).

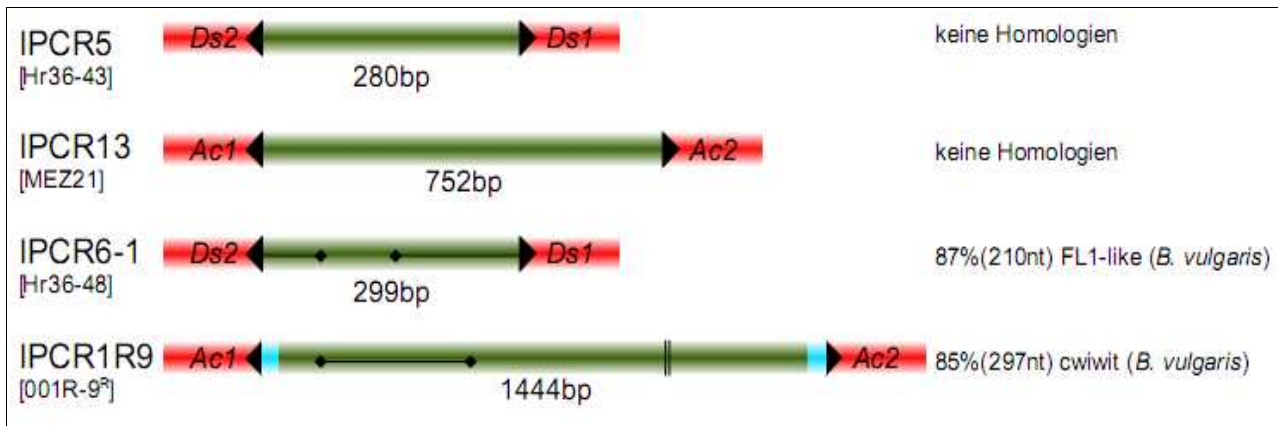


Abbildung 3.6: Schema der IPCR-Fragmente und in der Datenbank gefundene Homologien. Die Längenangaben unter den Fragmenten beziehen sich auf die unbekannte Sequenz zwischen den Ac/Ds-Enden. Die Sequenzen befinden sich im Anhang 7.1. Eckige Klammern: Bezeichnung der Pflanze bzw. hairy root Linie, in denen das Ereignis detektiert wurde; türkis: 8bp-Duplikation; Doppelstrich: Restriktionsschnittstelle der IPCR. Die IPCR-Fragmente stammen aus folgenden Arbeiten: IPCR5 und IPCR6-1 – eigene Diplomarbeit (Lisson 2002), IPCR13 – Diplomarbeit Schnettler (2003), IPCR1R9 – Bachelorarbeit Ringleb (2008).

Das Fragment IPCR6-1 aus DNA der Linie Hr36-48 besitzt eine 299bp lange Sequenz zwischen den *Ds*-Enden, von denen 210bp eine 87%ige Homologie zum *FL1* Gen (*FLC-like1*) aus *Beta vulgaris* (Acc. No. EF036526) besitzen. Die Übereinstimmung liegt in der 5'-UTR von *FL1* ca. 1000bp *upstream* des Translationsstarts. Für die IPCR-Fragmente IPCR5 und IPCR13 wurden bisher keine signifikanten Homologien gefunden.

Die Bestätigung, dass es sich bei den 5' und 3' Teilabschnitten der IPCR-Fragmente um einen zusammenhängenden genomischen Zuckerrüben-Lokus und nicht um ligierte Artefakte oder zwei unterschiedliche Integrationsorte handelt, erfolgt durch PCR-Nachweis des Integrationsortes in nicht-transgenen Wt-Zuckerrübenpflanzen. Die Primer wurden jeweils anhand der Sequenzen der 5' und 3' Teilabschnitte erstellt und sind in Richtung der Transposonenden orientiert. Für die IPCR-Fragmente IPCR1R9 und IPCR6-1 ergaben sich in der PCR Fragmente der erwarteten Größe von 200bp bzw. 420bp (Daten nicht gezeigt). Diese wurden kloniert und sequenziert. Die beiden anderen IPCR-Fragmente, IPCR5 und IPCR13, konnten nicht amplifiziert werden. Die Sequenzen von IPCR1R9 und IPCR6-1 benachbart zu den potentiellen Integrationsstellen sind in Abbildung 3.7 mit denen der aus Wildtyp amplifizierten Integrationsorte verglichen. Das Alignment zeigt einen Ausschnitt von 45bp um den Integrationsort. Die gesamten Sequenzen befinden sich im Anhang 7.1.

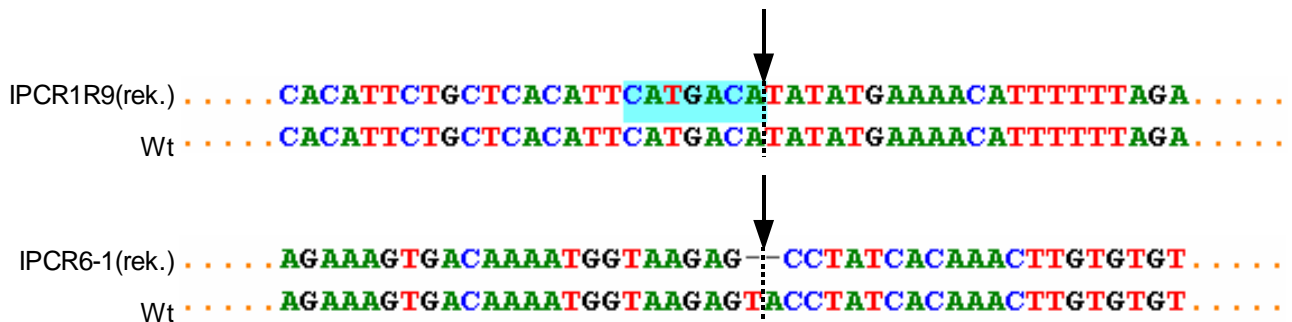


Abbildung 3.7: Sequenzalignment der IPCR-Fragmente und der Integrationsorte in Wt-Zuckerrübe. Die Sequenzen der IPCR-Fragmente wurden rekonstruiert (rek.), indem die Ac/Ds-Sequenz deletiert wurde und die Enden zusammengefügt wurden. Der Pfeil kennzeichnet die Integrationsstelle. Bei IPCR1R9(rek.) ist zusätzlich noch die 8bp Duplikation (türkis) entfernt. Die Daten für IPCR1R9 stammen aus einer Bachelorarbeit (Ringleb 2008), die von IPCR6-1 aus einer Studienarbeit (Machens 2007).

Bei IPCR1R9 stimmen die Sequenzen, unter Berücksichtigung der bei der Integration von Ac stattgefundenen 8bp Duplikation an der Integrationsstelle (türkis), exakt überein. Bei IPCR6-1 stimmen die Sequenzen bis auf die zwei, die Integrationsstelle flankierenden Nukleotide, exakt überein. Es fehlen ein Thymin und ein Adenin in der rekonstruierten Sequenz, die bei der Integration des Ac deletiert wurden. Eine 8bp Duplikation ist hier nicht aufgetreten.

Das Auffinden und die Überprüfung der Integrationsorte in Wildtyppflanzen beweist, dass die Transposition in Zuckerrüben erfolgreich abläuft.

### 3.2 Neue Konstrukte für die Markergeneliminierung

Die Anwendung des *Ac/Ds*-Transposonsystems für die Markergeneliminierung ist ein Aspekt der biologischen Sicherheit transgener Nutzpflanzen. Weiterhin ist es unter dem Gesichtspunkt der biologischen Sicherheit notwendig, die Herstellung transgener Nutzpflanzen kontrolliert ablaufen zu lassen und die entstandenen Pflanzenlinien genau charakterisiert vorliegen zu haben. Bei der *Ac* vermittelten Transposition von *Ds*-Elementen kann es zu Sekundärtranspositionen kommen, solange die *Ac*-Transposase in der Pflanze vorhanden und aktiv ist. Bei jeder Transposition entstehen *footprints*, die zu Mutationen führen können oder es kommt zur Vervielfältigung der Transposonelemente, wenn die Transposition während der Replikation abläuft und das Element vom replizierten Strang in einen noch nicht replizierten Bereich springt. Die doppelten Elemente müssten dann durch aufwendige Rückkreuzungen eliminiert werden. Zur Vermeidung dieser Sekundärtransposition sollen neue T-DNA Konstrukte erstellt und getestet werden, in denen die *Ac*-TPase nach der Primärtransposition durch ein *ihp*-Element gesilenced wird.

#### 3.2.1 Reduzierung der TPase-Transkriptmenge durch *ihp*-Elemente in *A. thaliana*

Die Transposaseaktivität soll nach der Primärtransposition herunter reguliert werden, um mögliche Sekundärtranspositionen zu vermeiden. Hierzu wurden verschiedene *ihp*-Elemente hergestellt, die durch RNAi die Transposase posttranskriptional silencen sollen. Um zu ermitteln, ob sich die Transkriptmenge durch die Anwesenheit der *ihp*-Elemente verringert, wurden die T-DNA Konstrukte *Acg* und *Acg-R* verwendet, die *Ac* enthalten sowie die T-DNA-Konstrukte *Acg-ihp200*, *Acg-R-ihp200*, *Acg-R-ihp400*, *Acst-ihp200* und *Acst-ihp400*, die *Ac* und *ihp*-Elemente enthalten (Abschnitte 2.9.3 und 2.9.4, Seite 33ff). Diese wurden in Agrobakterien transformiert und mittels der *floral dip*-Methode in *Arabidopsis thaliana* übertragen. Aus den unter Selektion angezogenen T0-Linien, wurden durch Selbstbestäubung die Nachfolgegenerationen F1 und teilweise F2 erzeugt. Über Segregationsanalysen der Nachkommen wurde die Anzahl der T-DNA Loci bestimmt, und ermittelt, ob die jeweils untersuchten Pflanzen homozygot oder heterozygot sind (Anhang 7.5). Die Eigenschaften der analysierten Pflanzenlinien sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Die Verlässlichkeit der jeweiligen Vorhersage ist durch das Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests ( $\chi^2$ ) mit einem Signifikanzlevel von  $\alpha=0,05$  abgesichert (Daten nicht gezeigt).

Bezeichnung der Linie	Konstrukt	Loci	Zygotie	Ac-Transkriptlevel
Wt	Wt	-	-	-
A1	Acg	1	heterozygot	++
A5		1	homozygot	++
A17		2	heterozygot	-
A9	Acg-R	1	heterozygot	++
A11		2	homozygot	++
A12		1	homozygot	+
A15		1	heterozygot'	+
i1	Acg-ihp200	1	homozygot	-
i3		1	homozygot	~
i13		1	heterozygot	-
i14		1	homozygot	-
i7	Acg-R-ihp200	1	heterozygot	-
i8		1	heterozygot	-
i11		1	homozygot	-
i20	Acg-R-ihp400	2	heterozygot	~
i21		2	heterozygot	-
i18	Acst-ihp200	2	heterozygot	+
i15	Acst-ihp400	1	homozygot	++

*Tabelle 3.2: Relative Ac-Transkriptmenge in transgenen A. thaliana Linien mit und ohne ihp-Element. Die Anzahl der T-DNA Loci und die Ermittlung der Zygotie der Pflanzen wurde über Segregationsanalysen ermittelt. Die Daten sind im Anhang 7.5 aufgelistet. Die Gelfotos der PCR-Ergebnisse sind im Anhang 7.6 zu finden.*

Aus den Pflanzen wurde RNA isoliert und die Ac-Transkriptmenge durch semiquantitative Multiplex-PCR mit 3 Primerpaaren ermittelt. Ein Primerpaar ist dabei so konzipiert, dass auch Kontaminationen der RNA-Proben mit genomischer DNA aufgezeigt würden. Die Amplifikatmenge im Verlauf der PCR wurde nach 20, 25, 30 und 35 Zyklen detektiert. Die Primer für die Ac-Transposase Ac1710 und Ac2419< (Abschnitt 2.7, Seite 25) binden im zweiten Exon von *Ac downstream* des Bereichs aus dem die *ihp* Sequenz stammt. Das Amplifikat hat eine Größe von 709bp (Abbildung 3.8). Als Kontrolle, dass die in der PCR eingesetzten cDNA-Proben keine genomische DNA-Kontaminationen enthalten, wurden zusätzlich Primer für das *gapC*-Gen eingesetzt (Abschnitt 2.7), mit denen aus genomischer DNA ein 332bp langer Bereich mit Intron amplifiziert wird. Die Amplifikationskontrolle mit genomischer DNA ist in den Spuren 14-17 (Abbildung 3.8) gezeigt. In keiner untersuchten Probe wurde eine DNA-Kontamination detektiert, weil jeweils nur ein Fragment von 239bp auftritt, was der Länge der *gapC*-mRNA ohne Intron



### 3 Ergebnisse

entspricht (Spuren 2-13). Als Referenz für die *Ac*-Transkriptmenge wurde die Transkriptmenge des *dhfr*-Gens verwendet, welches sich auch auf der T-DNA befindet. Das Primerpaar *dhfr8* und *dhfr522<* (Abschnitt 2.7) umschließt einen 514bp langen Bereich des *dhfr*-Gens (Abbildung 3.8, Spur 2-13). Die *dhfr* Transkriptmenge wird nicht durch das Silencing reguliert, so dass Unterschiede in der *Ac*-Transkriptmenge, die auf Positionseffekte zurückzuführen sind, minimiert werden. Die Abbildung 3.8 zeigt beispielhaft das Ergebnis der PCR für die Pflanzen A1 und A9 mit *Ac*, aber ohne *ihp*-Konstrukt und i20 mit *Ac* und *ihp*. Zu einem Zeitpunkt der PCR vor dem Sättigungszustand, in der ein vergleichbarer Level an *dhfr*-Transkript in den unterschiedlichen Ansätzen amplifiziert wurde, wird jeweils die zugehörige *Ac*-Transkriptmenge verglichen und in 4 Kategorien von sehr viel (++) über viel (+), bis wenig (~) und kein (-) Transkript eingeteilt (Tabelle 3.2). Die PCR-Ergebnisse der übrigen untersuchten Pflanzen, auf welche diese Einteilung beruht, befinden sich im Anhang 7.6.

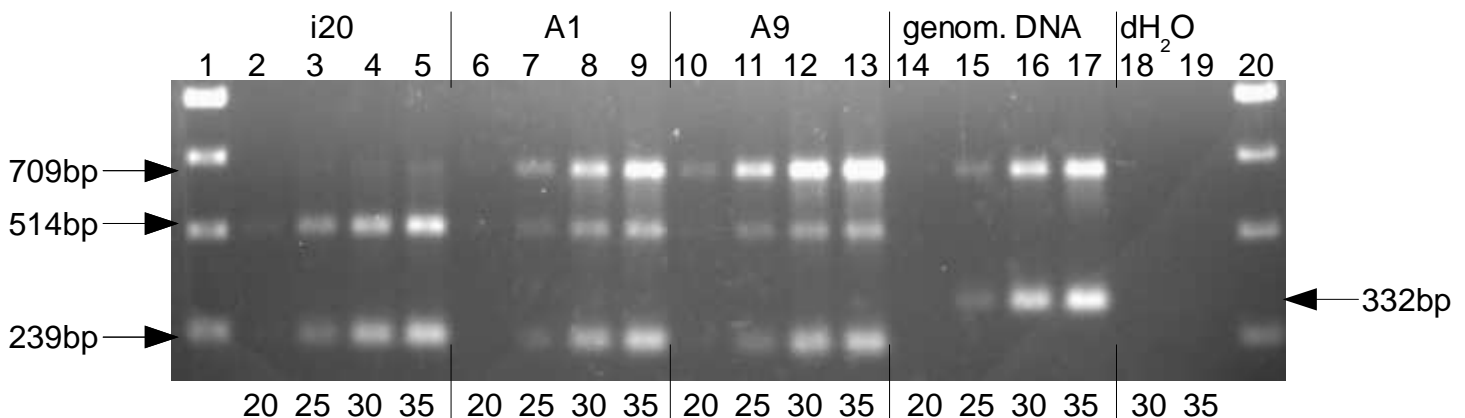


Abbildung 3.8: Gelfoto der Multiplex RT-PCR zur Untersuchung des Silencing der *AcTPase* durch *ihp*-Elemente. Unter dem Gelfoto sind die Anzahl der PCR-Zyklen angegeben. Spur 1 und 20: DNA-Größenstandard; Spur 18 und 19: PCR-Kontrolle mit  $dH_2O$  als template.

Bei der Probe i20 ist die *dhfr*-Transkriptmenge (514bp) nach 25 PCR-Zyklen (Spur 3) vergleichbar mit der Menge nach 30 Zyklen bei den Proben A1 und A9 (Spuren 8 und 12). Die *Ac*-Transkriptmenge bei jeweils gleicher Zyklenzahl ist bei der Probe i20, in der *Ac* durch *ihp* gesilenced wurde, kaum detektierbar (Spur 3, 709bp). Bei Probe A1 ist viel *Ac*-Transkript vorhanden (Spur 8) und bei Probe A9 sehr viel (Spur 12). In Spalte 5 der Tabelle 3.2 sind die *Ac*-Transkriptlevel für die untersuchten Linien zusammengefasst. Bei 6 von 7 untersuchten Pflanzenlinien (Präfix 'A' in der Linienbezeichnung, Tabelle 3.2), die Konstrukte mit *Ac* aber ohne *ihp* tragen, liegt viel bis sehr viel *Ac*-Transkript vor. Lediglich

bei Linie A17 wurde kein Transkript detektiert. Bei 9 von 11 Pflanzenlinien mit ihp-Element (Präfix 'i') liegt nur wenig bis kein Transkript vor, so dass hier das Silencing funktioniert hat. Ausnahmen sind die Linien i18 und i15, die viel bzw. sehr viel Transkript aufwiesen. Ein Einfluss der Zygotie der T-DNA Loci ist nicht festzustellen. Zum Beispiel weist die homozygote Linie A5 ebenso viel Transkript auf wie die heterozygote Linie A1, die das gleiche Konstrukt trägt. Oder die homozygote Linie i11 und die heterozygote Linie i7 weisen beide jeweils keine nachweisbare Transkriptmenge auf (Tabelle 3.2). Auch die Anzahl der vorhandenen T-DNA Loci korreliert nicht eindeutig mit der Stärke der Transkriptmenge. Zum Beispiel besitzen die Linien i20 und i21 jeweils 2 Loci, wobei i21 kein und i20 wenig Ac-Transkript enthält. Für eine genauere Analyse des Einflusses der Kopienzahl sind die vorliegenden Daten jedoch nicht ausreichend, da nur zwei A-Linien und drei i-Linie aus unterschiedlichen Konstruktgruppen zwei T-DNA Loci aufweisen.

Prinzipiell ist in der Mehrzahl der Linien ein deutlicher Silencing-Effekt durch die Anwesenheit des ihp-Elementes festzustellen.

#### **3.2.2 Neue T-DNA Konstrukte für die optimierte Markergeneliminierung mit ihp-Elementen und Gateway-Technologie**

Da die Markergeneliminierung ihr Einsatzgebiet in transgenen Nutzpflanzen hat, in denen unterschiedlichste Transgene eingeführt werden, wurde in die Konstrukte neben den ihp-Elementen die Gateway-Technologie integriert, die das schnelle und einfache Einklonieren der Zielgene erlaubt. Die T-DNA Vektoren, in die eine Vielzahl von Einzelabschnitten eingebaut wurden, besitzen hierfür häufig keine geeigneten Schnittstellen mehr. Über die Gateway-Technologie erfolgt das Einbringen der Zielgene mittels *in vitro* Rekombination von *att-sites*. Die Abbildung 3.9 zeigt schematisch den Aufbau der neu erstellten Konstrukte. Die Herstellung ist in Abschnitt 2.9.4 (Seite 34) beschrieben.

### 3 Ergebnisse

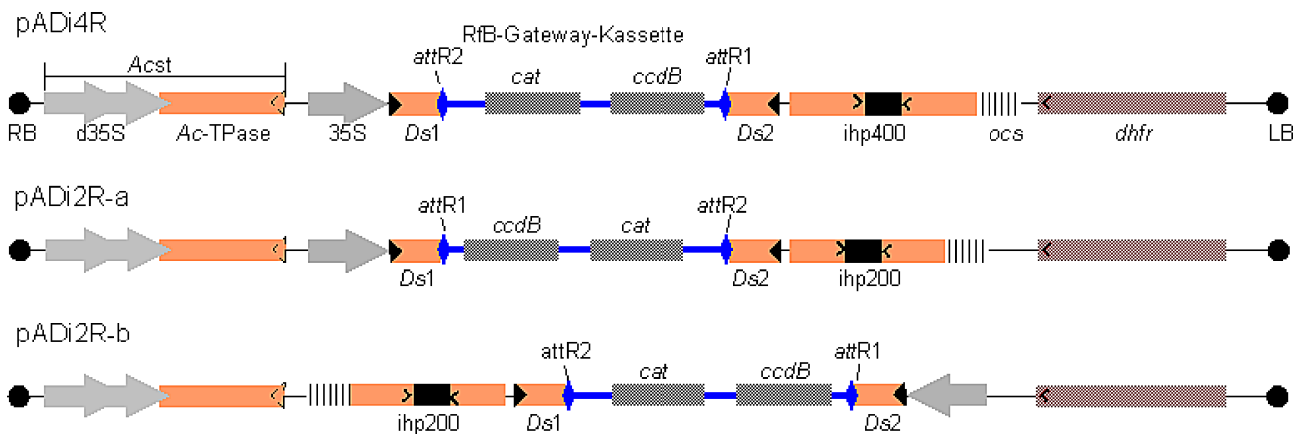


Abbildung 3.9: Schematischer Aufbau der Vektor-Konstrukte für die Markergeneliminierung. Die Namen setzen sich aus den Abkürzungen der Elemente zusammen, z.B. pADi4R = plasmid Acst Ds ihp400 RfB-Kassette. Weitere Details zum Aufbau befinden sich im Text.

Die T-DNA Vektoren pADi4R, pADi2R-a und pADi2R-b enthalten benachbart zur linken *border* (LB) das Gen *dhfr* für die Selektion der transformierten Pflanzen. Dieses kodiert eine Dehydrofolat-Reduktase und vermittelt Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Methotrexat. Benachbart zur rechten *border* (RB) befindet sich das *Acst*. Es setzt sich aus dem kodierenden und dem 3'-Bereich des *Ac* zusammen. Das 5'-Ende bis Position 923, in dem sich auch die *Ac*-TPase Promotorregion befindet, ist entfernt und durch einen starken doppelten 35S-Promotor (d35S) ersetzt. Von dem 11 Basenpaar langen *inverted repeat* am 3'-Ende (gestricheltes Dreieck) sind die letzten 4 Nukleotide deletiert. Ohne die intakten Enden ist die Transposition des *Acst* auszuschließen. Die *ihp*-Elemente *ihp400* und *ihp200* bestehen aus einem kodierenden Abschnitt aus dem zweiten Exon der *Ac*-Transposase, der in *sense* und *antisense* Orientierung (Pfeile > und <), getrennt durch ein Intron (schwarze Box), vorliegt. Beim *ihp400* ist der Abschnitt aus dem zweiten Exon 401bp lang und beim *ihp200* umfasst er 214bp. Das Intron stammt aus dem Gen einer Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase aus *Flaveria trinervia*. Dieses Intron wird standardmäßig für *ihp* Konstrukte verwendet, die effizientes Silencing in einer Reihe von Wirtspflanzen zeigen (Wesley *et al.* 2001). Der Promotor für das *ihp* ist ein 35S-Promotor aus dem CaMV. Zwischen Promotor und *ihp* ist das *Ds*-Element lokalisiert. Beim *Ds1* handelt es sich um 251nt vom 5'-Ende und beim *Ds2* um 321nt vom 3'-Ende des *Ac*. Neben den endständigen und für die Transposition essentiellen *inverted repeats* (schwarze Dreiecke) sind in den *Ds*-Elementen die subterminalen Bereiche mit Bindungsmotiven für die Transposase vorhanden. Innerhalb der *Ds*-Enden befindet sich die *RfB*-Kassette des Gateway Klonierungssystems. Diese ist begrenzt durch die *attachment sites attR1* und *attR2* (blaue Rauten), die zur Rekombination mit den *attL sites* dienen, mit deren Hilfe das

Zielgen von einem sogenannten Entry-Vektor übertragen wird. Zwischen den *att sites* liegt das *ccdB*-Gen, welches für einen DNA Gyrase Inhibitor kodiert und als negativer Selektionsmarker in *E. coli* wirkt. Außerdem ist ein *cat*-Gen vorhanden, das für eine Chloramphenicol Acetyltransferase kodiert und als positiver Selektionsmarker dient, um die Anwesenheit der RfB-Kassette bei der Klonierung in *ccdB* Survival®-Zellen verfolgen zu können. Dieses Gen vermittelt Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol.

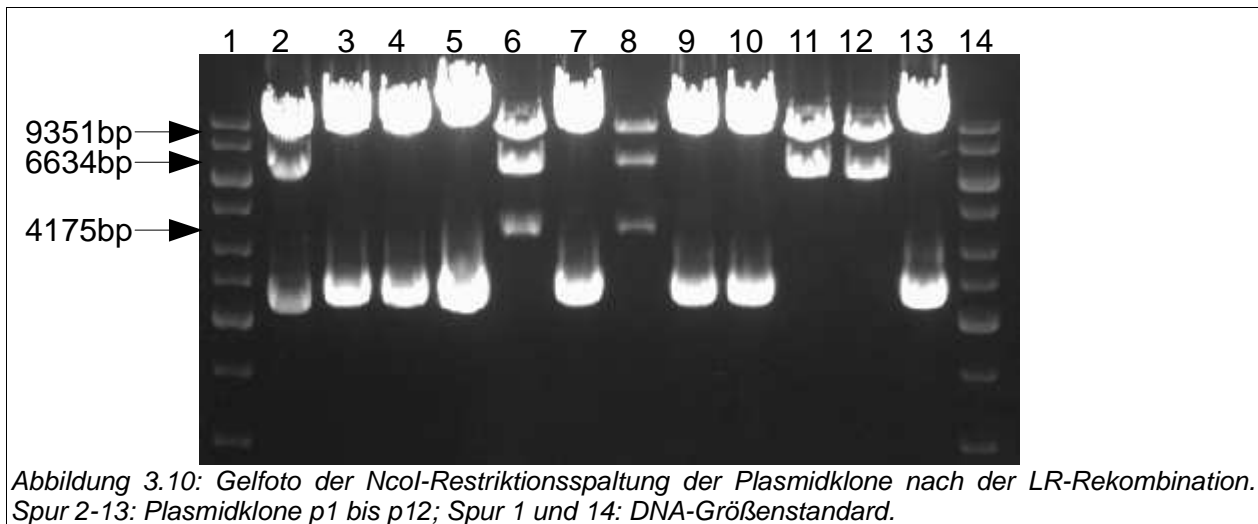
Das Vektorkonstrukt pADi4R enthält das längere *ihp400*-Element, die Vektorkonstrukte pADi2R-a und pADi2R-b jeweils das kürzere *ihp200*. Außerdem unterscheiden sich die Vektoren in der Orientierung einzelner Module zueinander (Abbildung 3.9).

Die Vektorkonstrukte enthalten jeweils alle Komponenten, die für die Anwendung zur Markergeneliminierung notwendig sind. Die Funktionalität der *ihp*-Elemente zur Regulierung der *Ac*-Transposaseaktivität sowie das Einklonieren von Genen in das *Ds*-Element mittels der Gateway-Technologie wurde untersucht (Abschnitte 3.2.1 und 3.2.3).

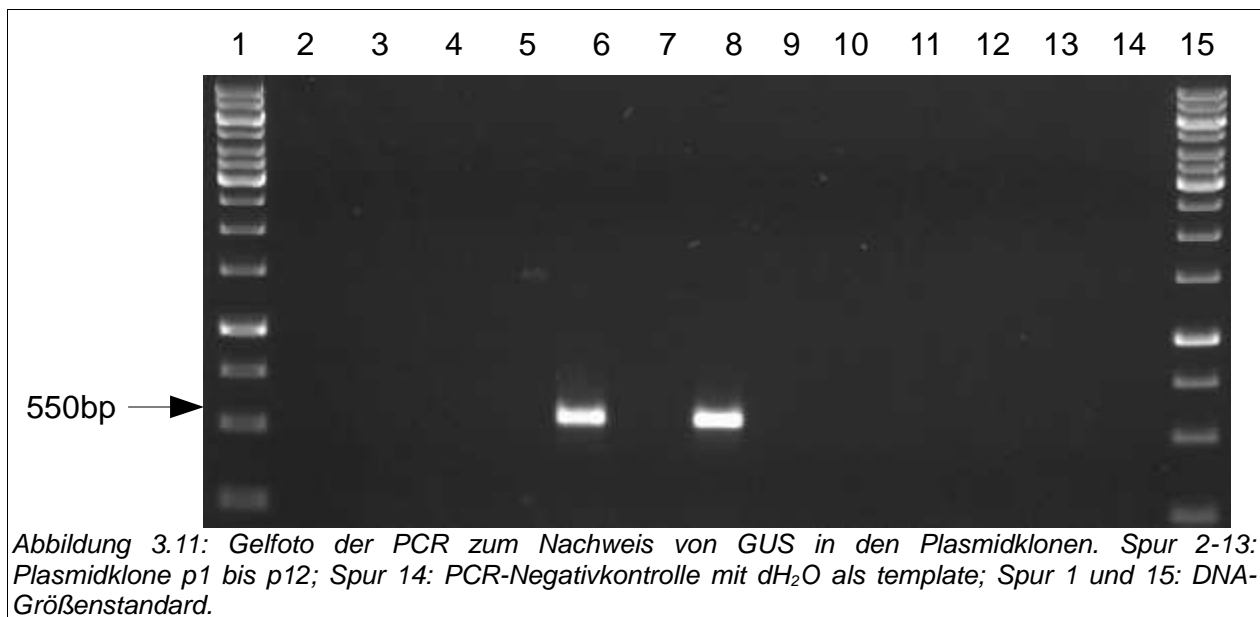
#### 3.2.3 Einklonierung von Zielgenen mittels Gateway-Technologie

Die Gateway-Technologie stellt einen alternativen Weg zum Einklonieren von DNA in einen Vektor dar. Gegenüber dem Klonierungsvorgang mittels Restriktionsenzymen und Ligation erweist sich das Gateway-System als schneller und weniger arbeitsintensiv. Ein Vorteil, der hier besonders zum Tragen kommt, da bei großen T-DNA Vektoren, bei denen schon viele Konstrukte eingebracht wurden, die Auswahl an Restriktionsschnittstellen stark limitiert ist.

Der Vorgang des Einbringens von Zielgenen wurde mit einem GUS-Konstrukt simuliert. Hierbei sollte die Funktionalität der *attachment sites* getestet werden. Es wurde die Rekombination des Vektors pADi2R-a (Abbildung 3.9) mit dem Vektor pENTR-GUS (Abschnitt 2.8, Seite 30) durchgeführt, wobei die RfB-Kassette innerhalb des *Ds* durch GUS ausgetauscht wurde. Nach Transformation des Ansatzes in *E. coli* Zellen und entsprechender Selektion wurde eine Plasmidisolierung und eine Testspaltung durchgeführt. Aufgrund der *ccdB*-Selektion hätten sich nur rekombinante Klone vermehren sollen. Es konnten jedoch nur 2 von 12 Klonen positiv getestet werden. Bei erfolgreicher Rekombination, treten bei der Plasmidspaltung folgende Bandengrößen bei der *Nco*I-Spaltung auf: 4175bp, 6634bp und 9351bp. Diese sind in den Proben p5 und p7 vorhanden (Abbildung 3.10, Spur 6 und 8).



Zur weiteren Absicherung der Ergebnisse wurde eine PCR zur Überprüfung der Anwesenheit des GUS-Gens durchgeführt. Im positiven Fall erhält man mit den Primern *gus\_L* und *gus\_R* (Abschnitt 2.7) ein Amplifikat von 550bp. Dieses konnte ebenfalls in den Proben p5 und p7 nachgewiesen werden (Abbildung 3.11, Spuren 6 und 8).



Die erfolgreiche Übertragung der GUS-Kassette in den T-DNA Vektor pADi2R-a zeigt, dass das Einbringen von Zielgenen über einen Entry-Vektor mittels Rekombination mit der Gateway-Technologie prinzipiell funktioniert.

### 3.3 Aktivierungstaggung in Tabak

Das Aktivierungstaggung stellt eine Methode dar, um neue Gene zu isolieren und zu charakterisieren. Im hier vorgestellten System wird das Mais-*Ac/Ds* Transposonsystem, kombiniert mit einem regulierbaren Transkriptionsaktivator-System, genutzt. Es soll die Frage geklärt werden, ob dieses Aktivierungstaggung-System prinzipiell funktioniert und ob es geeignet ist, um Gene aus Pflanzen zu isolieren und zu charakterisieren. Die Untersuchungen wurden in Tabakpflanzen durchgeführt, um den Nutzen an einer tetraploiden Modellpflanze zu demonstrieren, bei der die Anwendung der Insertionsmutagenese weniger effektiv ist, da eine Komplementation der ausgeschalteten Gene stattfinden kann. Der Transkriptionsaktivator LhG4 soll in diesem System auch die Möglichkeit der Regulierbarkeit der getaggtten Gene bieten, was für die Funktionsanalyse der Gene von Nutzen sein kann. Es soll untersucht werden, ob zum einen der Transkriptionsaktivator die Expression benachbarter Gene erhöht und ob diese *in planta* durch IPTG herunter reguliert werden kann. Des Weiteren soll ermittelt werden, welche Screeningbedingungen geeignet sind, um Phänotypen mit diesem System zu detektieren.

#### 3.3.1 LhG4 vermittelte Transkription

Der Transkriptionsaktivator LhG4 bindet an die Operatorsequenz innerhalb des *Ds*-Elementes und aktiviert die Transkription der benachbarten Gensequenzen. Diese Transkripte, beziehungsweise die daraus resultierenden Proteine können in der Pflanze zu einem veränderten Phänotyp führen, der in einem Screening detektiert werden kann. Die Transkripte können durch den *Ds*-tag isoliert werden. Für die Funktionsanalyse des getaggtten Gens kann es wichtig sein, dieses zu bestimmten Zeiten zu induzieren oder zu deaktivieren. LhG4 kann durch IPTG als Analogon für Laktose reguliert werden. LhG4 verliert bei Anwesenheit von IPTG seine Bindungsaffinität zur DNA und die Transkription wird herunter reguliert. Für die Untersuchung dieser Regulationsmöglichkeit *in planta*, wurden transgene Tabaklinien erzeugt, die das *DspOp* vor einem promotorlosen GUS-Gen tragen (Abschnitt 2.10.4, Seite 39). In diese Pflanzenlinien wurde dann der Transkriptionsaktivator LhG4 eingekreuzt. Das Wachstum fand auf Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von IPTG statt und es wurde die GUS-Aktivität in den Pflanzen verglichen. Die Diagramme in der Abbildung 3.12 zeigen die Ergebnisse für sieben untersuchte Linien. Die Einzelwerte der Reportergenaktivität sind im Anhang 7.4 aufgelistet.

### 3 Ergebnisse

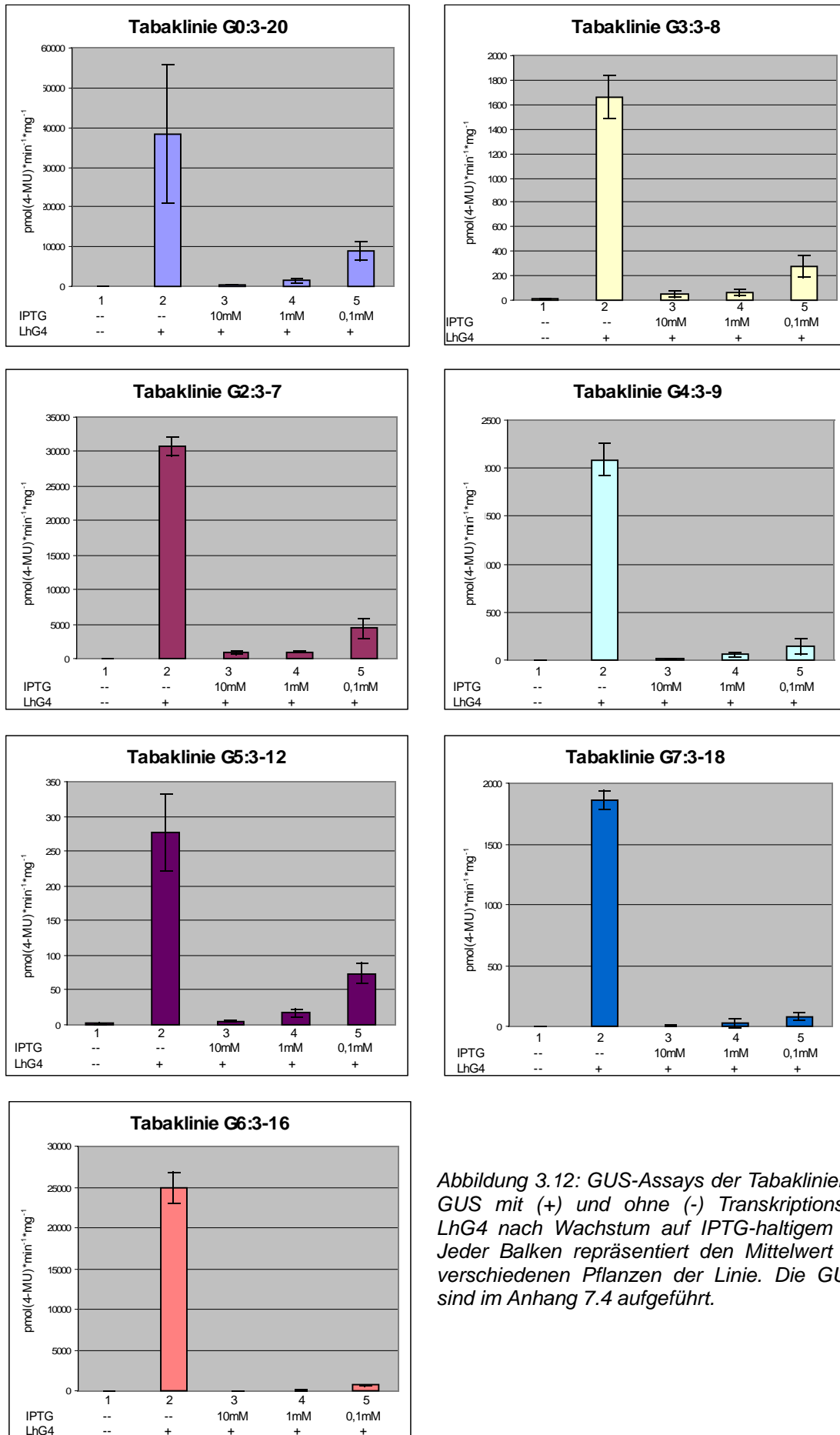


Abbildung 3.12: GUS-Assays der Tabaklinien mit Ds-GUS mit (+) und ohne (-) Transkriptionsaktivator LhG4 nach Wachstum auf IPTG-haltigem Medium. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von drei verschiedenen Pflanzen der Linie. Die GUS-Werte sind im Anhang 7.4 aufgeführt.

Der erste Balken in jedem Diagramm zeigt jeweils die Hintergrund-Aktivität in der jeweiligen *Ds*-GUS Linie ohne Transkriptionsaktivator LhG4, die zwischen 1,2 und 47,4pmol(4-MU)/(min·mg) liegt. Die GUS-Expression in Pflanzen, in denen *Ds*-GUS und LhG4 vorliegen, ist relativ hoch (Abbildung 3.12, Balken 2). Die Linien unterscheiden sich untereinander allerdings stark in ihrem Expressionsniveau. Der geringste GUS-Wert bei Linie 3-12 beträgt 277, der höchste GUS-Wert von 38407 ist in Linie 3-20 gemessen worden. Bei Wachstum auf IPTG-haltigem Medium jedoch sinkt die GUS-Aktivität bei allen Linien deutlich ab, da IPTG den Transkriptionsaktivator hemmt (Abbildung 3.12, Balken 3 bis 5). Diese Hemmung ist zudem konzentrationsabhängig. Bei Zusatz von 10mM ist die GUS-Aktivität am schwächsten und steigt bei geringeren Konzentrationen von 1mM und 0,1mM IPTG wieder an.

Die Ergebnisse simulieren eine potentiell aktivierte Genexpression von *Ds*-getaggen Genen durch den Transkriptionsaktivator LhG4 und die Möglichkeit der Regulierbarkeit des Transkriptionsaktivators *in planta* durch IPTG.



### 3.3.2 Ac vermittelte Transposition von *DspOp* in Tabak

Die Ac vermittelte Transposition von *Ds*-Elementen in Tabak ist prinzipiell schon vielfach gezeigt worden (Rommens *et al.* 1992, Hehl und Baker 1990). Jedoch muss diese für die konkret verwendeten Konstrukte neu experimentell bestätigt werden. Es kamen folgende Elemente zum Einsatz: das native Mais *Ac9*, ein stabiles Ac-Element *Acst*, *DspOp* und *DspOpKan*. Der Aufbau der Konstrukte ist in Abschnitt 2.9.5 (Seite 36) beschrieben. Die *Ds*-Elemente liegen jeweils zwischen 35S-Promotor und *bar*-Gen. Nach der Exzision der Elemente aus der T-DNA *donor site* in der transformierten Pflanze, wird auf dieser das *bar*-Gen aktiviert. Das exprimierte Enzym, die Phosphinothricin Acetyltransferase, vermittelt der Pflanze Resistenz gegenüber Phosphinothricin. Stattgefundene Transpositionereignisse können somit durch Wachstum auf Ppt-haltigem Medium identifiziert werden.

Die Ac und *Ds*-Konstrukte wurden zunächst mittels Blattscheibentransformation in Tabakpflanzen übertragen. Die regenerierten und selektierten Pflanzen wurden für Kreuzungen untereinander und mit Wildtyp-Pflanzen verwendet sowie selbstbestäubt. Die Nachkommengeneration wurde dann durch Segregationsanalysen auf die Anzahl der T-DNA Loci hin untersucht. Die Nachkommen der Kreuzungen Ac x *Ds* wurden weiterhin auf Exzisionsereignisse hin untersucht. Die Tabelle 3.3 zeigt die Ergebnisse der Segregation und Selektion der Kreuzungen zwischen den verwendeten Ac- und *Ds*-Linien. Aus dem Aufspaltungsmuster der Selbstungen und Rückkreuzungen geht hervor, dass die verwendeten Linien 1-1 (*DspOp*), D1-1a und D1-1b (*DspOpKan*), A1 und A3 (*Acst*) jeweils einen T-DNA Insertionsloкус tragen. Bei den Rückkreuzungen mit Wt sind erwartungsgemäß 50% der Nachkommen für das entsprechende Antibiotikum resistent, bei den Selbstungen sind es 75% (Tabelle 3.3). Die Linie Ac3-13-6 enthält bis zu 6 Kopien von *Ac9*, jedoch keinen Selektionsmarker, sodass die Aufspaltung von *Ac9* nicht verfolgt werden kann (Hehl und Baker 1990).

### 3 Ergebnisse

Kreuzung	Genotyp-Selektionsmarker	Hyg-Selektion	Kan-Selektion	Ppt-Selektion
A1 x Wt	Acst-Hyg	54,5%	0	0
A1 x A1	Acst-Hyg	73%	0	0
A3 x Wt	Acst-Hyg	50%	0	0
A3 x A3	Acst-Hyg	76,5%	0	0
D1-1a x Wt	DspOpKan-Hyg	56%	51%	0
D1-1a x D1-1a	DspOpKan-Hyg	76,1%	74,5%	0
D1-1b x Wt	DspOpKan-Hyg	60%	59%	0
D1-1b x D1-1b	DspOpKan-Hyg	76%	75%	0
1-1 x Wt	DspOp-Hyg	52%	0	0
1-1 x 1-1	DspOp-Hyg	72%	0	0
Ac3-13-6 x Wt	Ac9 (6x)	0	0	0
1-1 x Ac3-13-6	DspOp-Hyg, Ac9	56%	0	10,9%
A1 x D1-1a	Acst-Hyg, DspOpKan-Hyg	78,6%	54,1%	19,9%
A3 x D1-1a	Acst-Hyg, DspOpKan-Hyg	70,8%	50%	18,6%
A3 x D1-1b	Acst-Hyg, DspOpKan-Hyg	74,2%	53,7	21%

Tabelle 3.3: Segregation und Selektion der Tabaklinien mit Ac- und Ds-Elementen. Prozentualer Anteil der resistenten Pflanzen auf Kulturmedium mit Hygromycin, Kanamycin oder Phosphinothricin.

Auf Ppt-Medium wachsen 10-21% der Nachkommen aus den Kreuzungen Ac x Ds (Tabelle 3.3). Bei den Elternpflanzen liegt jeweils ein Insertionslokus der Elemente vor, da es sich bis auf die Linie Ac3-13-6 um Primärtransformanten handelt, sodass theoretisch bei 25% der Pflanzen der F1-Generation Ac und Ds zusammen vorliegen und es zur Transposition kommen könnte. Bezogen auf den theoretischen maximalen Segregationsanteil von 25%, bedeuten die experimentell gefundenen 18,6-21% eine Exzisionsrate zwischen 74,4 und 84%.

Zur Bestätigung der stattgefundenen Exzision wurde die *empty donor site* mit PCR amplifiziert. Hierfür wurde stichprobenartig DNA aus jeweils 16 Ppt-resistenten Pflanzen der Kreuzungen A1 x D1-1a und A3 x D1-1a verwendet. Die Primer liegen im 35S-Promotor und im *bar*-Gen. Bei stattgefundener Exzision ohne *footprint* entsteht ein Amplifikat von 253bp. Bei allen 32 Proben wurde ein Amplifikat von ca. 250bp erhalten, was der Größe der *empty donor site* entspricht. Die Abbildung 3.14 zeigt exemplarisch das PCR-Ergebnis für 16 untersuchte Pflanzen-DNAs AD3-1 bis AD3-16, die aus der Kreuzung A1 x D1-1a stammen. Ein weiteres PCR-Produkt von ca. 700bp, dass ebenfalls bei allen Proben auftritt, entsteht durch eine zweite Primer-Bindungsstelle im doppelten 35S-

Promotorbereich des Konstruktes (Abschnitt 2.9.5, Seite 36). Die Elternpflanze D1a, als Kontrolle mit dem *DspOpKan*-Element in der *donor site*, weist das erwartete Amplifikat von 3034bp auf. Die *Ac*-Elternpflanze (A1) weist wie erwartet kein Amplifikat auf und diente als Negativkontrolle.

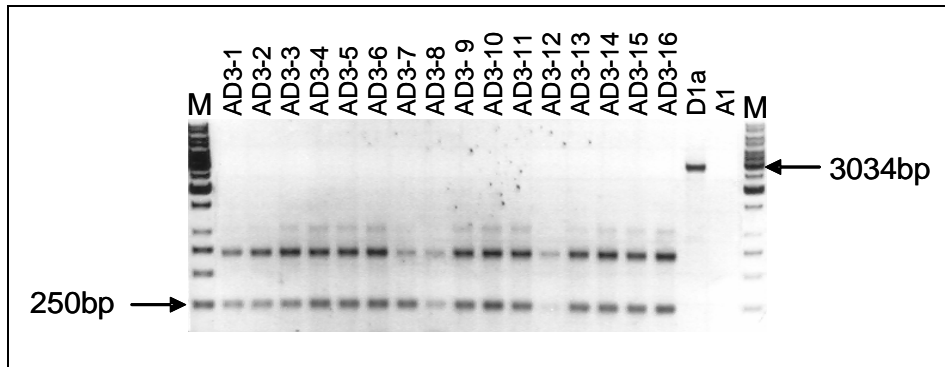


Abbildung 3.13: PCR-Gelfoto vom Nachweis der empty donor site. Als template diente DNA aus Tabakpflanzen der Linie AD3. D1a: Elternpflanze mit nicht transponierten *Ds*-Element in der donor site; A1: Elternpflanze mit *Acst* diente als PCR-Negativkontrolle; M:DNA-Größenstandard.

Es kann bei der Transposition auch eine Exzision, ohne anschließende Integration stattfinden, woraus der Verlust des Transposons in der Folgegeneration resultiert. Auch hier wurde zur Bestätigung für die Anwesenheit von *Ds* eine PCR mit den gleichen Proben wie für den Exzisionsnachweis durchgeführt. Die Primer liegen innerhalb des *DspOpKan*-Elementes. Für alle untersuchten Proben wurde das erwartete, ca. 2400bp große PCR-Amplifikat aus *DspOpKan* erhalten. Die Abbildung 3.14 zeigt exemplarisch das PCR-Ergebnis für AD3-1 bis AD3-16. Bei Probe AD3-5 ist der PCR-Reaktionsansatz verloren gegangen, die Bestätigung für die Anwesenheit von *DspOpKan* in dieser Probe wurde aber in einer späteren PCR-Reaktion erbracht.

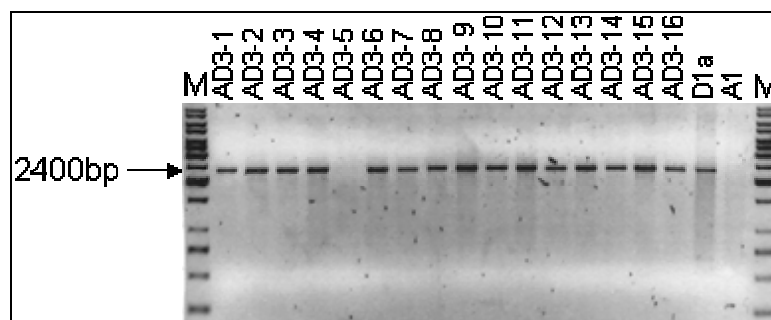


Abbildung 3.14: PCR-Gelfoto vom Nachweis der Anwesenheit des *Ds*-Elementes. Als template diente DNA aus Tabakpflanzen der Linie AD3, die ein transponiertes *DspOpKan* tragen. D1a: Elternpflanze mit *DspOpKan* in der donor site; A1: Elternpflanze mit *Acst*; M:DNA-Größenstandard.

Die stabile Integration der *Ds*-Elemente kann auch anhand der Kanamycin-Resistenz in den Nachkommen ermittelt werden. Die Ppt-resistenten Pflanzen wurden mit Pflanzen, die den Transkriptionsaktivator LhG4 tragen sowie mit Wildtyp-Pflanzen (Wt) gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzungen wurden auf Kanamycin-haltigem Medium selektiert. Bei stabiler *Ds* Integration ergibt sich ein Aufspaltungsmuster von 1:1 (resistente:sensitive Pflanzen). Es wurden pro Linie jeweils 2 Kreuzungen mit Wt und 2 Kreuzungen mit LhG4-Pflanzen durchgeführt. Für jede Linie wurde die Segregation der Nachkommen aus 1 bis 3 dieser Kreuzungen analysiert (Anhang 7.3). Von 109 untersuchten Linien zeigen 102 Linien das erwartete Aufspaltungsverhältnis bei allen untersuchten Kreuzungen und enthalten somit ein transponiertes *Ds* Element. Bei 7 Linien ist das *Ds*-Element nicht oder nur zum Teil in die Nachfolgegengeneration übergegangen.

#### **3.3.3 Selektion (Etablierung) von Tabaklinien für das Aktivierungstaggung**

Für die Untersuchung des Aktivierungstaggung im Phänotypen-Screening wurden Linien verschiedener Abstammung verwendet. Insgesamt wurden fünf Screenings durchgeführt. Bei zwei Screenings wurde nach morphologisch auffälligen Pflanzen auf Keimlingsebene geschaut. Einmal wurden Pflanzen auf Kulturmedium und einmal in Erdkultur untersucht. Weitere drei Screenings nach Pflanzen die Toleranz gegenüber Salzstress oder erhöhten Konzentrationen von Auxin (2,4-D) bzw. Abscisinsäure aufwiesen, wurden jeweils bei Anzucht auf Kulturmedium durchgeführt.

Die Pflanzen für das Screening nach morphologischen Auffälligkeiten auf Keimlingsebene in Erdkultur (Diplomarbeit Streitner 2003) stammen aus Kreuzungen von *DspOp* und *Ac9*. Die Nachkommen wurden auf Ppt-Medium auf Exzisionsereignisse hin selektiert. Die Ppt-resistenten Pflanzen wurden dann mit Pflanzen, die homozygot für den Transkriptionsaktivator LhG4 sind, gekreuzt. Anschließend wurden die Nachkommen selbstbestäubt, um einen großen Pool an Samen für das Screening zu erzeugen.

Die Population für die Screenings auf Kulturmedium hat ihren Ursprung in den Kreuzungen von Pflanzen mit stabilen *Acst* und *DspOpKan* (Tabelle 3.3, Abschnitt 3.3.2). Die Nachkommen AD3 aus Kreuzung A1 x D1-1a, AD22 aus A3 x D1-1a und AD23 aus A3 x D1-1b wurden mit Ppt als Marker für die Exzision und Kanamycin als Marker für das Vorhandensein des *Ds*-Elementes selektiert. Die Ppt/Kan-resistenten Pflanzen wurden mit homozygoten Pflanzen des Transkriptionsaktivators LhG4 gekreuzt, dessen Nachkommen die F3-Generation ADL1 bis ADL120 darstellen. Dieselben Pflanzen wurden auch mit

Wildtyp-Pflanzen gekreuzt und bilden die Kontrollpopulation ADW1 bis ADW120. Der Erfolg der Kreuzungen mit LhG4 wurde durch Segregation auf Methotrexat-haltigem Medium für die Anwesenheit des Transkriptionsaktivators überprüft. In 118 von 120 untersuchten ADL-Linien waren alle Nachkommen Methotrexat-resistent, wodurch das erfolgreiche Einkreuzen des Transkriptionsaktivators bestätigt wurde (Segregationsanalysen im Anhang 7.3). Die Screenings wurden mit ADL- und ADW-Saatgut auf Kanamycin-haltigem Medium durchgeführt, um die Anwesenheit des *Ds*-Elementes zu gewährleisten.

#### **3.3.4 Identifizierung phänotypisch auffälliger Tabakpflanzen**

Die *Ds*-Elemente integrieren bei der Transposition an beliebigen Positionen im Pflanzengenom. Der Transkriptionsaktivator LhG4 erzeugt Transkripte, die aus dem *Ds* heraus in die neue genomische Position laufen. Diese erzeugten Transkripte können zu Veränderungen in der Pflanze führen, die in einem Screening detektiert werden können. Es wurde in 5 verschiedenen Screenings nach phänotypisch auffälligen Pflanzen gesucht.

##### **a) Morphologisch auffällige Keimlinge in Erdkultur**

Das Screening nach Pflanzen mit morphologischen Veränderungen wurde mit Tabakkeimlingen durchgeführt, die in Erde ausgesät wurden. Die Keimlinge wurden visuell 2-4 Wochen nach der Aussaat auf Auffälligkeiten untersucht (Diplomarbeit Streitner 2003).

Hierfür wurden ca. 70000 Keimlinge eingesetzt. Es wurden 417 Pflanzen detektiert, die eine Veränderung in der Blattstruktur aufwiesen. Bei 311 Pflanzen zeigte sich ein ähnliches Merkmal nach der Keimung, nämlich fusionierte Kotyledonen, wobei diese Auffälligkeit verschiedene Ausprägungen hatte. Einige Beispiele sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Die Pflanze #19 besitzt fusionierte Kotyledonen und es haben sich keine Folgeblätter entwickelt. Bei Pflanze #18 hingegen, die ebenfalls leicht fusionierte Kotyledonen aufwies, bildeten sich die Folgeblätter aus, von denen eines leicht deformiert war. Bei Pflanze #200, die ebenfalls nach der Keimung fusionierte Kotyledonen besaß, waren alle Folgeblätter länglich verformt. Bei einigen Pflanzen waren die Kotyledonen so stark verwachsen, dass sich keine Folgeblätter etablieren konnten und das Keimlingstadium nicht überschritten wurde. Zum Beispiel sind bei Pflanze #349 die Kotyledonen zu einer kugelförmigen Struktur verwachsen (Abbildung 3.15). Der Anteil von

### 3 Ergebnisse

Pflanzen mit fusionierten Kotyledonen an der Gesamtanzahl gescreenter Pflanzen betrug ~0,44%. Einige der phänotypisch auffälligen Pflanzen aus diesem Screening wurden molekular weiter analysiert (Abschnitt 3.3.5).



Abbildung 3.15: Fotos der morphologisch auffälligen Linien, die im Screening in Erdkultur detektiert wurden. Die morphologischen Auffälligkeiten sind im Text beschrieben. Als Referenz für die normale Entwicklung und Blattstruktur ist eine Wildtyppflanze dargestellt.

Die Kontrollpopulation bestand aus SRI-Wildtyp-Pflanzen, von denen ca. 22500 untersucht wurden. Unter den Pflanzen der Kontrollpopulation konnten auch morphologisch auffällige Phänotypen detektiert werden und auch welche mit fusionierten Kotyledonen, allerdings mit einer wesentlich geringeren Rate. Es wurden insgesamt nur 15 morphologisch auffällige Pflanzen gefunden und nur 3, die in die Kategorie 'fusionierte Kotyledonen' fallen. Bezogen auf die Anzahl der gesamten gescreenten Pflanzen der Kontrollpopulation entspricht dies einer Rate von ~0,01%, also einem rund 40fach niedrigeren Wert.

#### b) Morphologisch auffällige Keimlinge auf Kulturmedium

Da bei dem Phänotypen-Screening in Erdkultur (Abschnitt a), aufgrund der Anzuchtbedingungen und der verwendeten Linien, nicht die Möglichkeit bestand, auf den vorliegenden Genotyp zu selektieren, wurde zusätzlich noch mit anderen Linien das Screening nach morphologischen Auffälligkeiten auf Kulturmedium durchgeführt. Die hierfür verwendeten Linien enthielten ein *Ds*-Element mit interner Kanamycin-Resistenz, mit dessen Hilfe die Anwesenheit des *Ds* in der Screeningpopulation gewährleistet wurde. Das Vorhandensein des Transkriptionsaktivators LhG4 in dieser Population wurde separat auf Methotrexat-haltigem Medium bestätigt (Abschnitt 3.3.3). Es wurden ca. 35000 Keimlinge

### 3 Ergebnisse

von 100 ADL-Linien analysiert. Die Kontrollpopulation bestand aus ca. 35000 Pflanzen der jeweils zugehörigen ADW-Linien. Es wurden insgesamt 10 Einzelpflanzen mit Veränderungen detektiert. Bei 3 Linien (ADL 33, 61 und 113), gab es Veränderungen, die alle Pflanzen betrafen. Die Tabelle 3.4 listet die Einzelpflanzen bzw. Linien mit dem gefundenen Phänotyp auf. Die Merkmale der Phänotypen umfassten Veränderungen in der Form und Anzahl der Kotyledonen, Veränderungen in der Blattstruktur oder -farbe oder ein verlängertes Hypokotyl.

Einzelpflanzen			Linien		
Bezeichnung	Linie	Beschreibung	Bezeichnung	Linie	Beschreibung
P78-1	ADL78	fusionierte Kotyledonen	P33	ADL33	gelbliches 3.-4. Blatt
P80-1	ADL80	fusionierte Kotyledonen			
P52-1	ADL52	fusionierte Kotyledonen	P61	ADL61	3.Blatt nach oben gebogen
P32-1	ADL32	herzförmiges Kotyledon			
P32-2	ADL32	drei Kotyledonen	P113	ADL113	zerknitterte Blattoberfläche
P29-1	ADL29	drei Kotyledonen			3.-4. Blatt gelblich
P40-1	ADL40	kugelförmiges Kotyledon			
P103-1	ADL103	fusionierte Kotyledonen			
P30-1	ADL30	verlängertes Hypokotyl			
P22-1	ADL22	kelchförmiges Kotyledon			

*Tabelle 3.4: Pflanzen und Pflanzenlinien, die im Screening auf Kulturmedium morphologisch auffällige Phänotypen zeigten.*

Die Abbildung 3.16 zeigt ergänzend die Bilder einiger Phänotypen der Einzelpflanzen. Die Abbildung 3.17 zeigt die Merkmale der veränderten Linien. Die Merkmale der Linien waren bei den Pflanzen 4 Wochen nach der Aussaat noch ausgeprägt. Nach dem Transfer in Erde jedoch war nach 2 Monaten kein Unterschied zu Wildtyppflanzen auszumachen. Bei den Keimlingen der Nachfolgegeneration trat keiner der vorher beobachteten Phänotypen wieder auf. Deshalb und aufgrund der molekularen Analyse der morphologisch auffälligen Pflanzen aus dem Screening in Erdkultur (Abschnitt a und 3.3.5), wurde auf eine weitere Analyse der hier gefundenen Pflanzen mit Veränderungen verzichtet.

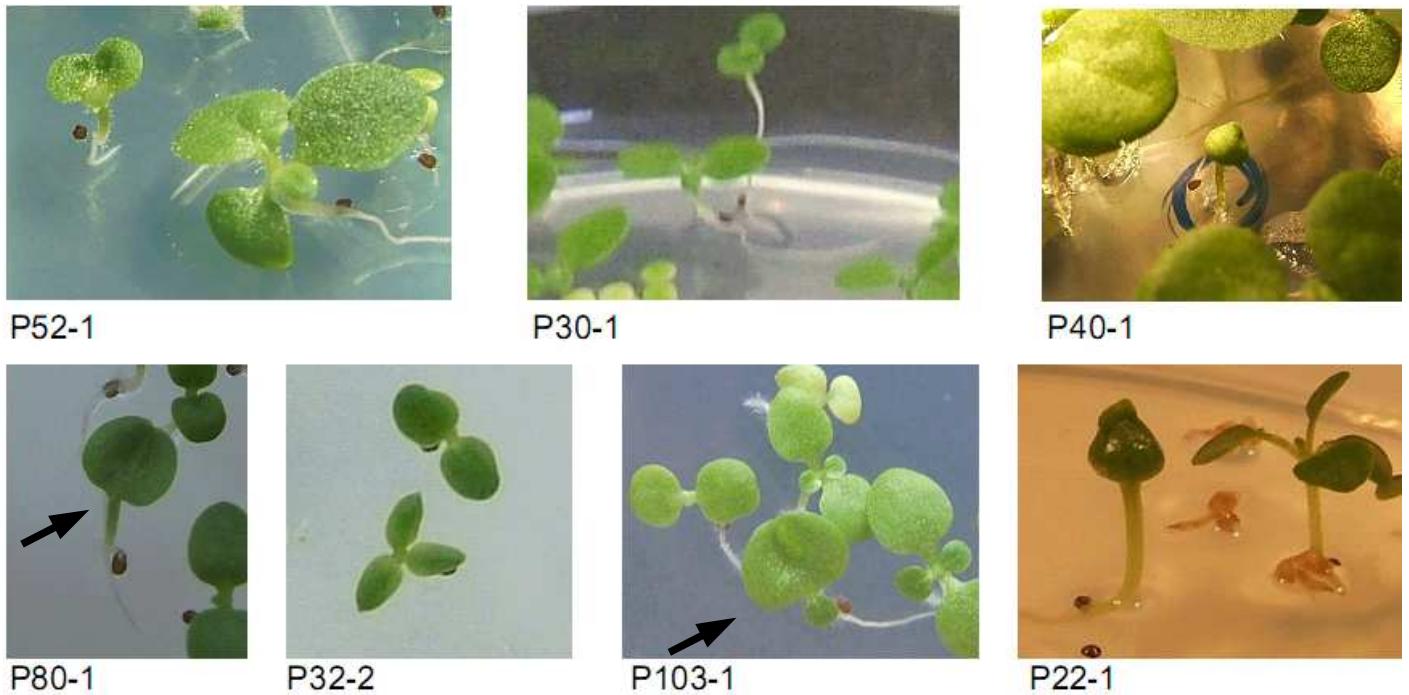


Abbildung 3.16: Fotos der morphologisch auffälligen Pflanzen, die im Screening auf Kulturmedium detektiert wurden. Die Beschreibungen sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.



Abbildung 3.17: Fotos der morphologisch auffälligen Linien, die im Screening auf Kulturmedium detektiert wurden. Die Beschreibungen sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

#### c) Salztolerante Pflanzen

Das Screening auf Salztoleranz wurde mit ca. 17000 Pflanzen aus 86 ADL-Linien durchgeführt. Die Kontrollpopulation bestand aus ca. 17000 Pflanzen der jeweils zugehörigen ADW-Linien. Es wurden 12 ADL-Linien gefunden, die zum gleichen Zeitpunkt einen höheren Anteil gekeimter Pflanzen aufwiesen wie die zugehörigen ADW-Linien. Zum Beispiel konnte in der Linie ADL8 nach 14 Tagen auf 160mM NaCl mehr gekeimte Samen beobachtet werden, als bei ADW8 und bei SRI-Wildtyppflanzen (Abbildung 3.18). Der



### 3 Ergebnisse

Unterschied war jedoch zeitlich begrenzt, da nach 21 Tagen eine vergleichbare Anzahl auf beiden Platten gekeimt waren und kein Unterschied in der Entwicklung untereinander auszumachen war. Alle gekeimten Pflanzen besaßen nach 21 Tagen die Kotyledonen, teilweise den Ansatz des 1. Folgeblattes und einige eine bis zu 5mm lange Wurzel. Es bestand jedoch ein deutlicher Unterschied zu der normalen Entwicklung von Pflanzen auf Medium ohne Salzzusatz. Diese Pflanzen besaßen bereits das 4-5 Folgeblatt und eine bis zu 20mm lange Wurzel (Abbildung 3.18). Der leicht unterschiedliche Keimungszeitpunkt, wie hier am Beispiel der Linie 8 dargestellt, konnte jedoch in einer Wiederholung des Screenings für keine Linie reproduziert werden und ist eventuell auf die unterschiedliche Positionierung der Platten im Lichtschrank zurückzuführen. Einzelpflanzen, die eine erhöhte Salztoleranz aufwiesen, konnten im Screening nicht identifiziert werden.

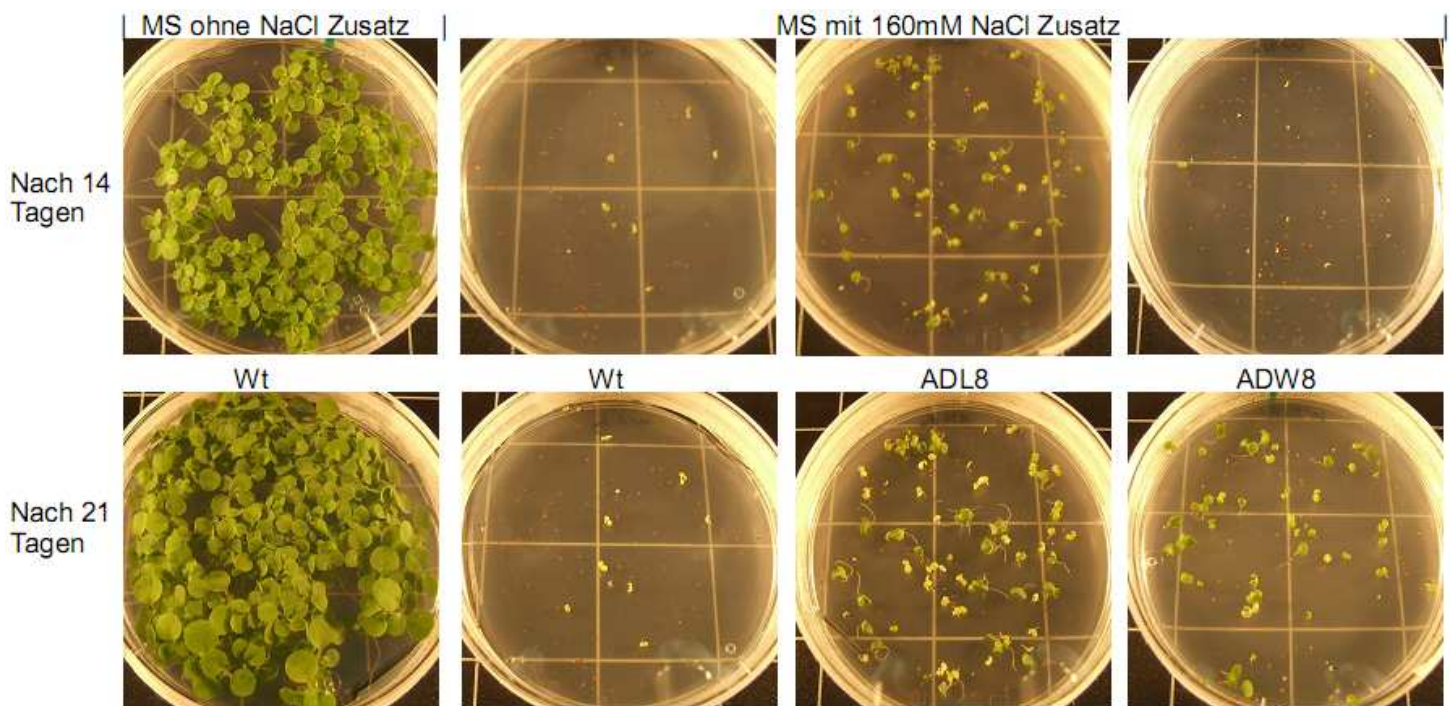


Abbildung 3.18: Fotos von der Entwicklung von Tabakkeimlingen beim Screening auf salztolerante Phänotypen 14 und 21 Tage nach der Aussaat.

#### d) Abscisinsäure-tolerante Pflanzen

Es wurden ca. 9000 Pflanzen von 47 ADL-Linien auf verändertes Wachstum bei erhöhter Abscisinsäure-Konzentration untersucht. Die gleiche Anzahl Pflanzen wurde von den jeweils zugehörigen ADW-Linien untersucht. Bei 8 Linien konnte eine frühere Keimung gegenüber Wildtyp-Pflanzen beobachtet werden. Die Abbildung 3.19 zeigt repräsentativ die Linie 46. Allerdings unterschieden sich die zusammengehörigen ADL und ADW

### 3 Ergebnisse

Pflanzen nicht untereinander. Nach 14 Tagen haben sich die Kotyledonen ausgebildet. Das Wurzelwachstum wird jedoch fast vollständig unterbunden. Bei der Entwicklung auf ABA-freiem Medium erreichten die Pflanzen nach 14 Tagen das Dreiblattstadium und die Wurzeln waren durchschnittlich 15mm lang. Linien, bei denen eine Veränderung nur bei den ADL und nicht bei den ADW-Kontrollen auftraten, wurden nicht gefunden. Es konnten auch keine Einzelpflanzen mit erhöhter Toleranz gegenüber ABA detektiert werden.

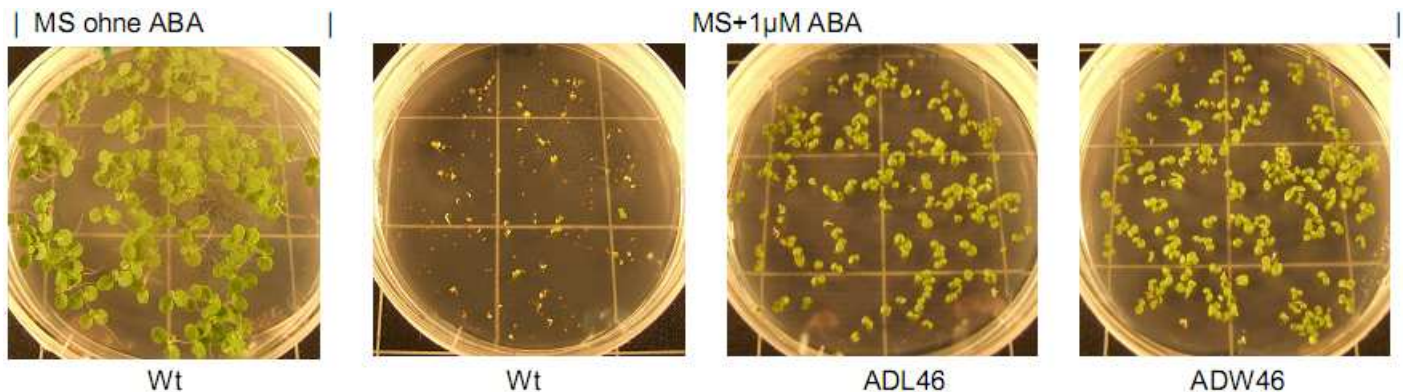


Abbildung 3.19: Fotos von der Entwicklung von Tabakkeimlingen beim Screening auf ABA-tolerante Phänotypen 14 Tage nach der Aussaat.

#### e) Auxin-(2,4-D) tolerante Pflanzen

Im Screening auf Auxintoleranz wurden ca. 10000 Pflanzen von 55 ADL Linien und die gleiche Anzahl von den zugehörigen ADW-Linien auf Medium mit 2,4-D untersucht.

Es konnten keine Pflanzen detektiert werden, die eine erhöhte Toleranz gegenüber 2,4-D besitzen (Daten nicht gezeigt).

#### 3.3.5 DspOp und LhG4 vermittelte Transkription

Der Transkriptionsaktivator LhG4 bindet mit seiner DNA-Bindungsdomäne an die Operatorsequenz innerhalb des *Ds*-Elementes. Durch die Aktivierungsdomäne des LhG4 kann die Transkription aus dem *Ds*-Element heraus initiiert werden (Abschnitt 3.3.1). Die entstehenden Transkripte, die durch die Aktivierung in überexprimierter Form in der Pflanze vorliegen können, können zu phänotypischen Veränderungen führen. In den Screenings (Abschnitt 3.3.4) wurden zum Beispiel phänotypisch auffällige Pflanzen mit morphologisch abnormaler Blattstruktur detektiert. Um zu ermitteln, ob neu entstandene

### 3 Ergebnisse

Transkripte aus dem *Ds* für die Veränderung verantwortlich sind, können diese mit Hilfe des *Ds*-tags isoliert werden. Aus einigen Pflanzen, die morphologische Auffälligkeiten im Screening der Keimlinge in Erde aufwiesen (Abschnitt 3.3.4, a), wurde RNA isoliert, die dann für eine RT-PCR eingesetzt wurde. Als Primer dienten *Ds*-spezifische Primer, die im 5'-nichttranslatierten *leader* der neuen Transkripte liegen sollten, da die Transkripte im *Ds*-Element beginnen und ein modifizierter oligo-dT Primer, der am polyA-Schwanz bindet. Das Ergebnis der RT-PCR ist in Abbildung 3.20 für 13 Pflanzen dargestellt. Die 13 Pflanzen besaßen alle fusionierte Kotyledonen. Die getesteten Pflanzen #19 und #200 sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Als Positivkontrolle für die RT-PCR diente eine Pflanze mit *Ds*-GUS Konstrukt und LhG4 Aktivator (Abschnitt 2.10.4, Seite 39). Das erwartete *Ds*-GUS Transkript sollte ca. 2100bp lang sein und konnte durch die RT-PCR bestätigt werden (Spur 1 und 19, Abbildung 3.20). Als Negativkontrolle für die unspezifische Primerbindung wurde Wildtyp SRI (Spur 2 und 18) und Pflanzen der Linie K1548 (Spur 3 und 4) eingesetzt. Letztere enthalten *DspOp* und *Ac*, aber nicht den Transkriptionsaktivator. In allen Kontrollen treten unspezifische Banden von etwa 1000bp auf. In den Pflanzen mit Transkriptionsaktivator sind jedoch zusätzlich ein oder mehrere Amplifikate zwischen 250bp und 1000bp vorhanden, die bei den Kontrollen nicht zu finden sind (Spur 5-17).

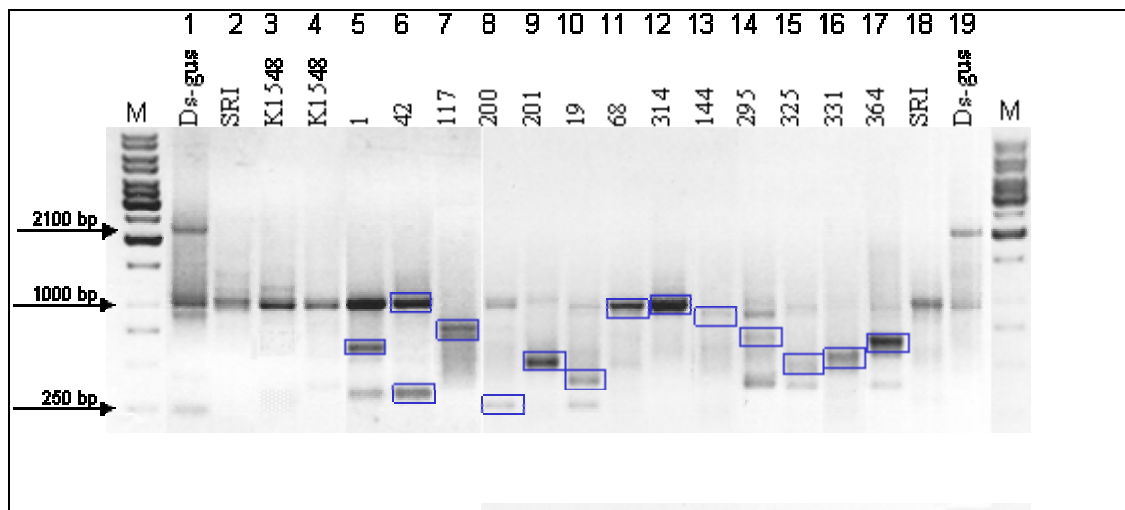


Abbildung 3.20: Gelfoto der RT-PCR zum Auffinden von aktivierten *Ds*-Transkripten. Das RNA-Material stammt aus Pflanzen, die im Screening fusionierte Kotyledonen zeigten (Spur 5-17). SRI: Wildtyppflanze; K1548: Pflanze mit *Ac* und *Ds*, aber ohne LhG4; *Ds-gus*: Pflanze mit *Ds*-GUS Konstrukt und LhG4; M: DNA-Größenstandard.

Von den 14 in Abbildung 3.20 eingerahmten RT-PCR Produkten wurden 9 erfolgreich kloniert und sequenziert. Bei zwei Fragmenten (201 und 295) handelte es sich um Transkripte aus einem nichttransponierten *Ds*-Element, die hinter dem *Ds*-tag eine Sequenz des *bar*-Gens aufwiesen (Sequenzdaten nicht gezeigt). Bei drei Fragmenten (42, großes Fragment; 68 und 314) handelte es sich um unspezifische Amplifikate ohne den *Ds*-tag (Sequenzdaten nicht gezeigt). Für die vier Amplifikate 1, 200, 325 und 364, bei denen *Ds*-tag und oligo-dT Primer durch Sequenzierung bestätigt wurden und in denen keine Artefakte der *bar*-Sequenz der ursprünglichen *donor site* enthalten waren, wurde mit dem Bereich hinter dem *Ds*-tag nach Homologien zu bekannten Genen oder Proteinen in Datenbanken gesucht. Der schematische Aufbau der Transkripte und die gefundenen Homologien sind in Abbildung 3.21 dargestellt, die Sequenzen befinden sich im Anhang 7.1.

Das Transkript 1 besitzt die größte Homologie zum C-terminalen Ende (ca. 68aa/204nt) von Pektinmethylesterasen (PME) verschiedener Pflanzenspezies. Für Transkript 200 wurde keine signifikante Homologie gefunden. Das Transkript 325 zeigt Homologie zu einem ca. 77aa (233nt) langen Bereich von Aminosäure-Transportern (AAP) verschiedener Pflanzenspezies. Das Transkript 364 zeigt Homologie zu einem Teil (ca. 40aa/260nt) einer WD40 Domäne am C-terminalen Ende von G-Protein  $\beta$ -Untereinheit ähnlichen Proteinen verschiedener Pflanzenspezies.

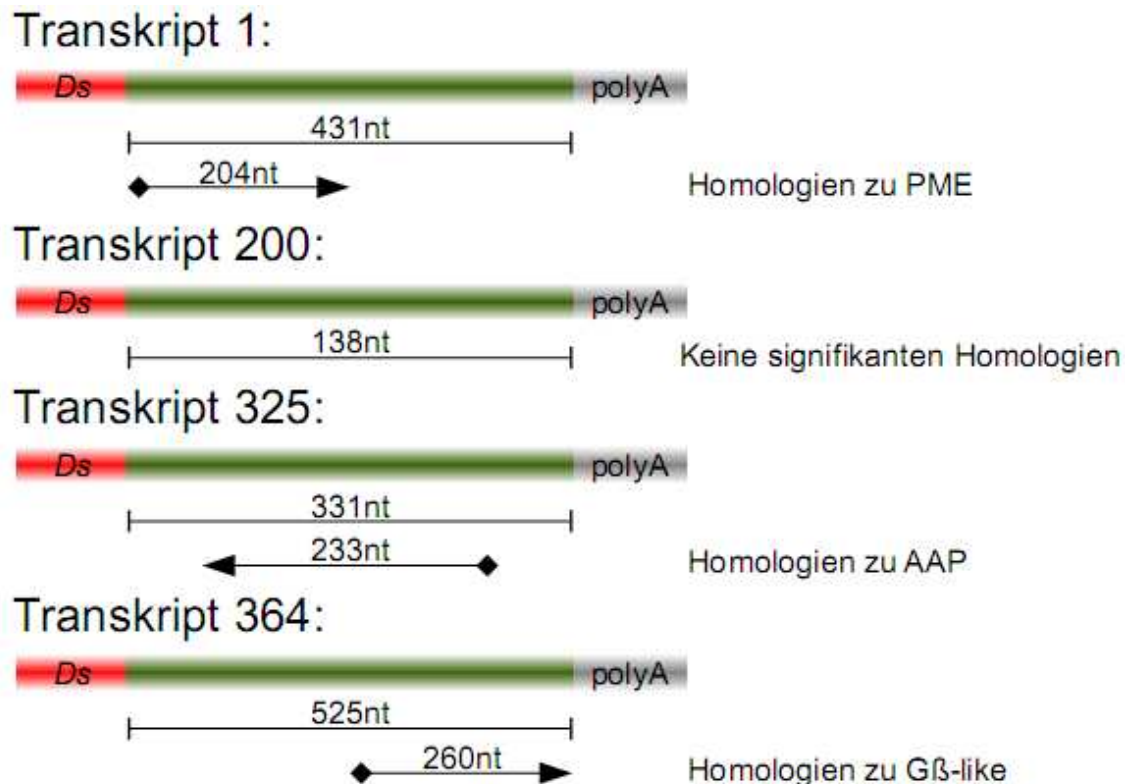


Abbildung 3.21: Schematische Darstellung der Transkripte und Homologien in Datenbanken. Die Transkripte stammen aus Tabakpflanzen, die im Screening fusionierte Kotyledonen aufwiesen. Durch die Striche ist die Länge der Ds benachbarten Sequenz bis zum polyA-Schwanz in den Transkripten angezeigt. Die Pfeile zeigen die Bereiche, Länge und Orientierung zu gefundenen Homologien an.

Die vier Transkripte stammen aus Pflanzen mit fusionierten Kotyledonen. Die Pflanzen 325 und 364 zeigten sehr stark verwachsene Kotyledonen, die weitere Entwicklung fand nicht statt und die Pflanzen verblieben im Keimlingsstadium. Die Pflanze 1 wies ein leicht deformiertes 3. Blatt auf, weitere Folgeblätter zeigten keine Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp, jedoch war die Pflanze steril und brachte keine Samen hervor. Die Pflanze 200 zeigte anfänglich auch fusionierte Kotyledonen, später bildeten sich jedoch länglich verformte Folgeblätter aus (Abbildung 3.15). Die adulte Pflanze zeigte Zwergwachstum, weitere Blätter waren länglich verformt und sie bildete keine Blüte aus.

Da von den Pflanzen keine Nachkommen erhalten wurden, die phänotypisch analysiert werden können, wurde versucht, die Phänotypen mit den gefundenen Transkripten in Tabakpflanzen zu reproduzieren. Hierzu wurde das fehlende 5' DspOp-Ende, das nicht in der cDNA vorlag, vervollständigt. Drei der vier erstellten Konstrukte wurden erfolgreich in Tabak transformiert und die etablierten Linien mit LhG4-Linien gekreuzt. In den Nachkommen sollte die gleiche Konstellation vorliegen, wie im Screening. Der Aktivator

sorgt für die erhöhte Transkription aus den *Ds*-Elementen heraus, es entstehen also die gleichen Transkripte, die aus den phänotypisch auffälligen Pflanzen isoliert wurden. Die Pflanzen wiesen allerdings keine abnormalen Strukturen auf (Daten nicht gezeigt). Es konnte also auf diese Weise keiner der vorher gefundenen Phänotypen reproduziert werden.



## 4 Diskussion

### 4.1 Markergeneliminierung in transgenen Nutzpflanzen

Die Landwirtschaft ist darauf angewiesen, neue Sorten zu züchten, um den Ertrag zu sichern und sich wandelnden Umwelteinflüssen anzupassen. Außerdem soll der Eintrag von chemischen Substanzen gegen Fraßfeinde und Pilze möglichst reduziert werden, um die Umwelt zu schonen und Kosten zu sparen. Der Einsatz von gentechnischen Methoden bei der Züchtung ist ein effizientes Werkzeug, um die Nutzpflanzen gezielt zu verbessern. Die Technik der Genübertragung erfordert jedoch in den meisten Fällen den Einsatz von Markergenen, die neben dem Zielgen mit der erwünschten Veränderung in die Pflanzen übertragen werden. Diese dienen zur Selektion der transgenen Linien, haben jedoch keinen Nutzen bei der Anwendung der Linie in der Landwirtschaft. Häufig handelt es sich um Antibiotika- oder Herbizid-Resistenzgene, deren Auswirkungen und Verbreitung in der Natur nur schwer zu erfassen sind. Daher ist es wünschenswert, diese vor dem Ausbringen der Pflanzen zu eliminieren. Eine Methode, um dieses Ziel zu erreichen, ist der Einsatz des Mais *Ac/Ds*-Transposonsystems (Yoder und Goldsbrough 1994). Von einem T-DNA Vektor findet die Transposition des Zielgens, das von *Ds*-Enden flankiert ist, statt. Bei Integration in eine nicht mit der T-DNA *donor site* gekoppelten genomischen Region, findet in der Folgegeneration die Segregation der Loci statt und es werden Pflanzen ohne Markergen und T-DNA-Sequenz erhalten. Die Möglichkeit dieses System zu nutzen, setzt ein effizientes Funktionieren in der heterologen Wirtspflanze voraus. Zum einen muss die Transposition überhaupt ablaufen, zum anderen soll sie möglichst kontrolliert erfolgen. Die regulierte Transposition ist wichtig, um Mutationen, die durch Sekundärtranspositionen und *footprints* entstehen können, zu vermeiden. Dafür wurde ein Vektorsystem entwickelt, das ein *ihp*-Element zum Silencing der *Ac*-Transposase nach Primärtransposition des *Ds*-gekoppelten Zielgens enthält. Um zu ermitteln, ob dieses System in Zuckerrüben zur Anwendung kommen kann, wurde das Transpositionsverhalten von *Ac/Ds*-Elementen in Zuckerrüben analysiert.

#### 4.1.1 Ein spezifischer Transpositionsmechanismus in der Zuckerrübe?

Für eine Vielzahl von Nutzpflanzen wurde gezeigt, dass die Transposition von den aus

Mais stammenden *Ac*- und *Ds*-Elementen prinzipiell funktioniert, zum Beispiel in *Oryza sativa* (Enoki *et al.* 1999), *Hordeum vulgare* (Scholz *et al.* 2001), *Triticum aestivum* (Takumi 1996), *Lycopersicon esculentum* (Belzile und Yoder 1992). In dieser Arbeit konnte die Transposition auch für die Zuckerrübe, *Beta vulgaris*, gezeigt werden.

Bei der Exzision der Elemente werden als charakteristisches Merkmal *footprints* an der *donor site* hinterlassen, die ein bis zwei Nukleotide umfassen. Hier wurde in allen untersuchten Ereignissen eine Deletion von einem Nukleotid beobachtet und bei der Mehrzahl die Veränderung eines zusätzlichen benachbarten Nukleotids (Abbildungen 3.4 und 3.5, Seite 67). Diese *footprints* lassen sich mit den zwei gängigsten Modellen für den Exzisionsprozess, dem '*template switching model*' und dem '*hairpin model*' in Einklang bringen (Kunze und Weil 2002). Das '*template switching model*' geht davon aus, dass durch die TPase 8bp versetzte *nicks* benachbart zu den Transposonenden entstehen. Nach dem Schnitt bleibt der DNA-Proteinkomplex für eine gewisse Zeit erhalten. An den 8bp Überhängen setzt die DNA-Reparatur-Synthese ein, und es kann zum *template switching* vom Überhang der *donor site* zum Überhang am Transposon kommen. Gleichzeitig sind die Einzelstrang-Überhänge Angriffsziel von Exonukleasen, wodurch es zum Abbau von Nukleotiden kommt. Der Reparaturvorgang schließt mit dem Zusammenfügen der veränderten Enden ab (Saedler und Nevers 1985). Beim '*hairpin model*' schneidet die Transposase benachbart zu den *inverted repeats* und erzeugt Enden mit einem 1bp 5'-Überhang. Die freien Enden ligieren mit sich selbst durch eine Transesterifikation und bilden jeweils eine Haarnadelstruktur aus. Anschließend erfolgt in der Haarnadelschleife an beliebiger Stelle ein *nick*. Bevor die Enden miteinander ligieren, sind sie für gewisse Zeit Abbaureaktionen ausgesetzt, die zur Deletion von Nukleotiden führen können. Nach Ligation der Enden werden fehlende Nukleotide durch Polymerasen vervollständigt (Kunze und Weil 2002).

Die *footprints*, die hier bei der Transposition in der Zuckerrübe gefunden wurden (Abbildungen 3.4 und 3.5, Seite 67), können bezogen auf die einzelnen Enden so betrachtet werden, dass entweder keine Veränderung stattgefunden hat (4 Enden), ein Nukleotid deletiert wurde (10 Enden) oder ein Nukleotid verändert wurde (6 Enden). Am Einfachsten kann das Auftreten dieser *footprints* durch einen 1bp versetzten Schnitt wie er vom '*hairpin model*' postuliert wird, erklärt werden, wobei die Formierung der Haarnadelstruktur zur Erklärung der Deletion eines Nukleotids und dem Auftreten der unveränderten Enden nicht unbedingt nötig ist. Die Abbildung 4.1 zeigt ein Modell für die Entstehung der *footprints* am Beispiel der *hairy root* Linie Hr35-19. Die Deletion von



Nukleotiden an den Enden könnte direkt durch Exonuklease vermittelten Abbau des 1bp Überhangs am Ende erfolgt sein (Abbildung 4.1, Möglichkeit b). Bei den unveränderten Nukleotiden könnte es direkt zur Ligation der Enden gekommen sein, wobei die jeweils fehlende komplementäre Base zum 1bp-Überhang durch eine Auffüllreaktion ergänzt wurde. Die Fälle, bei denen ein Nukleotid verändert wurde, könnten am Einfachsten entstehen, indem der *nick* der Haarnadelschleife genau ein Nukleotid weiter 3' neben der Position erfolgt, an dem sich die Schleife geschlossen hat (Abbildung 4.1, Möglichkeit a). Bei anschließender Ligation der Enden und Auffüllreaktion entsteht dann im *footprint* die jeweils komplementäre Base zum 1bp-Überhang, so wie dies bei allen 6 gefundenen Fällen auftritt (Abbildungen 3.4 und 3.5, Seite 67). Das Auftreten der gefunden *footprints* lässt sich zwar auch mit dem *template switching model* erklären, jedoch hätte man hier eine größere Variabilität erwartet und das Auftreten von *footprints*, die sich über mehrere Nukleotide erstrecken wären wahrscheinlicher.

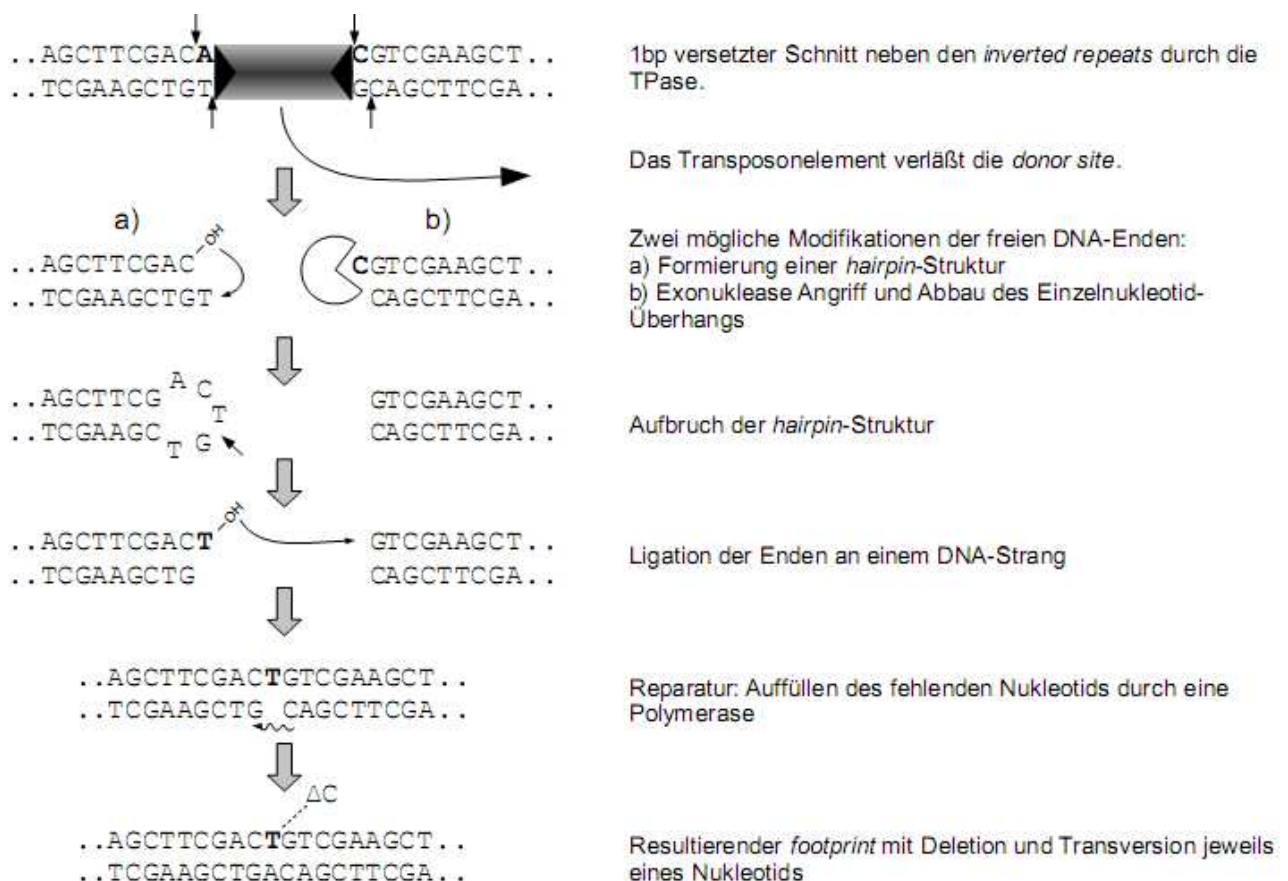


Abbildung 4.1: Modell für die Entstehung von footprints am Beispiel von Hr35-19 (Hairpin-Modell, modifiziert nach Kunze und Weil 2002)

Die erfolgte Integration der Transposonelemente in der Zuckerrübe konnte nur für zwei

Ereignisse vollständig bestätigt werden (Abschnitt 3.1.3, Seite 68). In beiden Fällen gab es Homologien zu Regionen aus Genen, was vermuten lässt, dass die Integration in transkriptionsaktive Regionen des Genoms erfolgte. Dies ist konform mit bisherigen Beobachtungen, dass die *Ac/Ds*-Elemente bevorzugt in Gene integrieren. Zum Beispiel wurden die Integrationsorte von *Ds* in der Tomate zu 60% in Genen lokalisiert (Meissner *et al.* 2000), wobei zu berücksichtigen ist, dass sich das Gen-reiche Euchromatin nur auf etwa 23% des Tomatengenoms konzentriert (Peterson *et al.* 1996). Auffällig ist, dass bei einem der beiden Integrationsereignisse in der Zuckerrübe keine charakteristische 8bp Duplikation auftritt, wie sie für die Integration von *Ac/Ds* typisch ist (Kunze und Weil 2002). Stattdessen tritt in diesem Fall eine Deletion von 2 Nukleotiden auf. Da es sich um ein Einzelereignis handelt, ist nicht davon auszugehen, dass in der Zuckerrübe ein einzigartiger Integrationsmechanismus im Vergleich zu anderen Pflanzen vorliegt, obwohl auch endogene Wirtsfaktoren beim Integrationsprozess eine Rolle spielen (Yu *et al.* 2004). Abweichende Integrationsereignisse ohne Duplikation oder mit einer 1bp langen Duplikation sind bisher nur im Fall bei Transposition von reversen *Ds*-Enden dokumentiert worden (Krishnaswamy *et al.* 2008). Es wäre möglich, dass es sich bei den hier in der Zuckerrübe gefundenen Fall um ein selten auftretendes zufälliges Ereignis handelt. Die Integration könnte zum Beispiel auch an einem vorhandenen Chromosomenbruch erfolgt sein, der durch NHEJ (non-homologous end joining) zwischen den Transposonenden und den freien genomischen Enden geschlossen wurde.

Die Exzision in der Zuckerrübe findet nach einem Standardmechanismus statt, wie er auch in bisher untersuchten heterologen Wirtspflanzen auftritt. Für die Integration liegen zwei unterschiedliche Ereignisse vor. Ob in der Zuckerrübe ein abweichender Integrationsprozess ohne 8bp Duplikation genauso häufig auftritt wie der ohne, kann anhand der wenigen bisher gefundenen Ereignisse noch nicht geklärt werden.

### **4.1.2 Die *Ac*-TPase wird *in planta* durch ein *ihp*-Element gesilenced**

Die Transposition von *Ac* und *Ds* Elementen wird durch die Transposase vermittelt. Die Aktivität des Enzyms ist in verschiedenen Wirtspflanzen unterschiedlich ausgeprägt. In Mais wurde zum Beispiel ein negativer Dosis-Effekt beobachtet. Vielfach vorliegende Kopien des *Ac*-Elements senken die Transpositionsrate, was vermutlich auf Aggregatbildung des Enzyms zurückzuführen ist (Heinlein *et al.* 1994). In heterologen Pflanzenarten ist die Transpositionsfrequenz sehr unterschiedlich und in vielen finden

Transpositionereignisse eher selten statt. Entweder durch Erhöhung der *Ac*-Kopienzahl oder durch Verwendung alternativer stärkerer Promotoren vor der TPase kann ein positiver Dosis-Effekt erzielt werden und somit die Transpositionsfrequenz erhöht werden (Hehl 1994, Honma *et al.* 1993). Da die Transposition nach einem *cut and paste* Mechanismus abläuft und die reintegrierten Elemente vollständig erhalten bleiben, kann es, solange die Transposase aktiv ist, zu weiteren, sogenannten Sekundärtranspositionen, kommen. Jede Transposition hat einen *footprint* zur Folge und birgt damit ein Risiko, dass die Sequenzveränderung zu einer Mutation führt. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, für die gezielte Herstellung von transgenen Nutzpflanzen unter Verwendung eines *Ac/Ds*-Transposonsystems, die Transposition reguliert ablaufen zu lassen. Im entwickelten System wird dies erreicht, indem die Transposase durch Gen-Silencing mittels RNAi inhibiert wird. Dazu wird ein *ihp*-Konstrukt verwendet, das nach der Primärtransposition von *Ds* durch einen starken Promotor aktiviert wird. Die reduzierte *Ac*-Transkriptmenge bei Anwesenheit von *ihp*-Elementen konnte experimentell *in planta* gezeigt werden (Abbildung 3.8, Seite 73). Es bestand nicht die Möglichkeit zur Nutzung einer Real-time PCR. Jedoch wurde erfolgreich eine Multiplex-PCR etabliert, die für die Quantifizierung der Transkriptmenge eingesetzt werden konnte. Dabei wurde die Transkriptmenge des *dhfr*-Gens, das sich auf derselben T-DNA wie das *Ac* befand, als Referenz für die Amplifizierbarkeit an dem entsprechenden Insertionsloкус der T-DNA genutzt. Die Verfolgung der PCR-Produktzunahme über die Zeit (Zyklenzahl) ließ das Sättigungsniveau der PCR-Reaktion erkennen. In 9 von 11 *Arabidopsis* Linien, die ein *ihp*-Element tragen, konnte kein oder nur wenig Transkript der *Ac*-Transposase detektiert werden. Im Vergleich dazu liegt in 6 von 7 Linien ohne *ihp* viel bis sehr viel *Ac*-Transkript vor. Es ist wahrscheinlich, dass die Reduzierung der *Ac*-Transkriptmenge ausreicht, um zu einer Inhibierung der *Ac*-Transposaseaktivität zu führen und damit Sekundärtranspositionen unterbunden werden.

### **4.1.3 Die Anwendung des Mais-*Ac/Ds* Transposonsystems zur Herstellung markergenfreier Nutzpflanzen**

Bei der Herstellung von transgenen Nutzpflanzen wird besonderen Wert auf die biologische Sicherheit gelegt. Es soll keine Gefahr für Mensch und Umwelt durch das Inverkehrbringen der erzeugten Linien entstehen. Ein Aspekt, der kritisch diskutiert wird, ist das Vorhandensein von Antibiotika-Resistenzgenen, die häufig nur im Entstehungsprozess der transgenen Linie benötigt werden, aber nicht die eigentliche

nutzbringende Eigenschaft darstellen. Die Auswirkungen auf die Umwelt, zum Beispiel horizontaler Gentransfer und Verteilung in der Nahrungskette, sind nur schwer abzuschätzen (van den Eede *et al.* 2004). Ein horizontaler Gentransfer ist unter natürlichen Bedingungen bisher noch nicht beobachtet worden. Jedoch erlaubt es der Stand der Technik es, wenn auch etwas arbeitsintensiver, markergenfreie Pflanzen herzustellen. Hierfür können auch transponierbare DNA-Elemente eingesetzt werden (Yoder und Goldsbrough 1994). Ein Vorteil der Verwendung von Transposons zur Markergeneliminierung im Vergleich zur Kotransformationsmethode (Huang *et al.* 2004) ist, dass mit wenigen Primärtransformanten gearbeitet werden kann, um viele verschiedene Integrationslinien zu erzeugen. Dies ist ausschlaggebend, da sich die meisten landwirtschaftlichen Nutzpflanzen nur schwer transformieren lassen (Qu *et al.* 2008). Außerdem besteht bei der T-DNA Transformation die Gefahr, dass zusätzlich weitere unerwünschte Sequenzen aus den Vektoren mit übertragen werden, die ebenfalls einen sicherheitsrelevanten Faktor in den transgenen Pflanzen darstellen können. Dieser Aspekt spielt bei Verwendung eines Transposonsystems keine Rolle, da der Integrationsort an einer nicht mit der T-DNA gekoppelten Position liegen kann, woraufhin nach Segregation in der Folgegeneration sämtliche T-DNA Sequenz eliminiert werden kann.

Ein solches System wurde in dieser Arbeit entwickelt und experimentell untersucht. Die konstruierten T-DNA Vektoren tragen alle Komponenten für eine Markergeneliminierung, sowie eine Gateway-Kassette für das einfache und schnelle Einbringen von Zielgenen in das *Ds*-Element. Auf der T-DNA befinden sich ein Selektionsmarker, die *Ac*-TPase, das *Ds*-Element mit Gateway-Kassette und ein *ihp*-Element (Abbildung 3.9, Seite 75). Nach Einbringen des Zielgens in das *Ds*-Element können transgene Pflanzen durch Agrobakterium vermittelte Transformation erzeugt werden, die dann mit Hilfe des Selektionsmarkers selektiert werden. In diesen Pflanzen wird die *Ac*-TPase exprimiert und vermittelt die Transposition von *Ds*-Zielgen. Durch die Exzision wird das *ihp* aktiviert, was zum Silencing der *Ac*-Transposase führt und Sekundärtranspositionen vom *Ds*-Zielgen Element verhindern soll. Nach Rückkreuzung oder Selbstbestäubung der Pflanzen wird eine Segregation von T-DNA und *Ds*-Zielgen erreicht, so dass Pflanzen ausgewählt werden können, die nur das Zielgen flankiert von den minimalen *Ds*-Enden enthalten und keine Antibiotika-Resistenzmarker oder sonstige T-DNA Sequenzen. Die einzelnen Komponenten wurden auf ihre Funktionalität hin erfolgreich getestet. Die Prüfung der Anwendbarkeit des Systems auf eine Nutzpflanze muss in Zukunft individuell ermittelt

werden. Wichtig ist hier, dass die Transposition von *Ac/Ds* in der Kulturart effizient funktioniert. Es muss eine Transposition von *Ds* in eine distale Region vom T-DNA Locus erfolgen, so dass eine Segregation von *Ds* und T-DNA in der Nachfolgegeneration stattfindet. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass bei wiederholter Anwendung des Systems, mit dem Ziel in eine transgene Pflanzenlinie weitere Gene einzubringen, das vorher integrierte *Ds*-Zielgen wieder reaktiviert werden kann und weiter transponiert.

Der Einsatz des *Ac/Ds*-Transposonsystems stellt eine gute Ergänzung zu alternativen Systemen für die Markergeneliminierung dar, wie zum Beispiel Cre/*lox*- und FLP/FRT-Rekombinationssysteme, an deren Anwendung ebenfalls intensiv geforscht wird (Zhang et al. 2003, Jia et al. 2006). Die Kombination mehrerer Methoden sollte in Zukunft die Möglichkeiten der modernen Pflanzenzüchtung erweitern.

### 4.2 Aktivierungstaggung in Tabak

Das Aktivierungstaggung stellt eine Methode dar, um neue Pflanzengene zu isolieren und zu charakterisieren. Die *Ac* vermittelte Transposition von *Ds*-Elementen führt zu Integrationsstellen, die über einen großen Bereich des Genoms verteilt liegen. Im Gegensatz zum Aktivierungstaggung mit T-DNA sind somit nur wenige Primärtransformanten erforderlich, was bei schwer transformierbaren Pflanzenspezies vorteilhaft ist. Die Transkriptionsaktivierung findet durch LhG4 statt, der an den Operator innerhalb des *DspOp*-Elements bindet und die Transkription am jeweiligen Integrationsort initiiert. Die aktivierten Transkripte können zu Veränderungen in den Pflanzen führen, nach denen gescreent werden kann. Die Isolierung der dafür verantwortlichen Transkripte erfolgt mittels des *Ds*-tags.

#### 4.2.1 Zusammenhang zwischen den neu entstandenen Transkripten mit den morphologischen Auffälligkeiten bei Tabakkeimlingen

Aus vier phänotypisch auffälligen Pflanzen, die im Screening aufgrund von fusionierten Kotyledonen detektiert wurden, konnten vollständige Transkripte isoliert werden (Abbildung 3.21, Seite 93). Um einen Zusammenhang zwischen dem Phänotyp und den überexprimierten Transkripten zu ermitteln, wurde nach Homologien in Datenbanken

gesucht. Das Transkript 1 zeigt eine Homologie zu einer Pektinmethylesterase (PME). Pektinmethylesterasen katalysieren die De-esterifikation von Homogalakturonan, welches zur Gruppe der Pektine gehört und ein Bestandteil von pflanzlichen Zellwänden ist. Es dient als Einbettung für die Cellulosefibrillen und verbindet die Zellwandbestandteile (Micheli 2001). Da durch die Zellwände die Struktur und Form der Pflanzenorgane geprägt ist, könnten durch die Beeinflussung der PME-Expression die fusionierten Kotyledonen als veränderte Struktur hervorgerufen worden sein. Im Transkript ist jedoch nur der C-Terminus (ca. 68aa) der PME (ca. 300aa) vorhanden. Durch dieses Transkript kann also keine Überexpression des gesamten Proteins erfolgen. Es gäbe im Transkript ein ATG-Startcodon an Position 2 hinter dem *Ds*-Ende, wodurch ein 26aa langes Translationsprodukt entstehen könnte. Jedoch fehlen diesem gekürzten Protein noch die Signalpeptide, um seine Funktion in der Zellwand ausüben zu können.

Das Transkript 325 zeigt eine Homologie zu Aminosäure-Permeasen (AAP) auf. Diese spielen eine zentrale Rolle für den Stickstofftransport durch das Leitgewebe, um Zellen des Meristems zu versorgen (Okumoto *et al.* 2004). Das Transkript liegt in reverser Orientierung vor. Hier ist ein siRNA Mechanismus oder die Regulation durch antisense RNA denkbar. Da es sich bei den AAP um eine Genfamilie handelt, die konservierte Bereiche enthalten, ist das Silencing mehrerer AAP denkbar. Eine Inhibierung von Aminosäuretransportern führt zur Mangelversorgung von Stickstoff in sich entwickelndem Gewebe (Lee *et al.* 2007). Dies könnte die veränderte Morphologie des Keimlings und das Ausbleiben des weiteren Wachstums erklären.

Das Transkript 364 zeigt Homologie zu einem Teil einer WD40 Domäne von ArcA-Genen aus Pflanzen. Diese sind G-Protein  $\beta$ -Untereinheit ähnliche Proteine, die in Signaltransduktionswegen involviert sind (Chen *et al.* 2006). Die WD40 Domäne vermittelt die Protein-Protein Interaktion. Hier könnte spekuliert werden, dass das vom Transkript 364 überexprimierte Protein Bindungseigenschaften besitzt und eventuell ein Molekül in einer Signalkette blockiert und so zur Entwicklungsmutante führt. Damit jedoch ein Translationsprodukt für den Bereich der gefundenen Homologie entsteht, müsste die Translation erst am achten ATG, an Position 249 hinter dem *Ds*-Ende, beginnen.

Für das Transkript 200 ist aufgrund nicht vorhandener Homologien keine Spekulation über die Funktion möglich und es kann kein Zusammenhang zwischen dem Transkript und dem Phänotyp abgeleitet werden.

Aus keiner der vier Pflanzen, aus denen die Transkripte isoliert wurden, konnten

Nachkommen gewonnen werden, deshalb wurde versucht, die Phänotypen zu rekonstruieren, indem gleiche Bedingungen wie im Screening hergestellt wurden. Drei der Transkripte wurden mit dem fehlenden Bereich des *DspOp* am 5'-Ende ergänzt. Nach Einbringen in Tabak wurde der Transkriptionsaktivator LhG4 eingekreuzt. Es traten bei keiner Pflanze in der Nachfolgegeneration die ursprünglichen Phänotypen mit fusionierten Kotyledonen oder veränderter Blattstruktur wieder auf. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in den Pflanzen, die ursprünglich gescreent wurden Sekundärtranspositionen auftraten, so dass *Ds* somatisch weitertransponiert ist und es zur Vervielfältigung von *Ds*-Insertionen kam und damit nach Aktivierung zur Überexpression mehrere Transkripte. Ein Hinweis darauf ist in der RT-PCR (Abbildung 3.11, Seite 77) zu finden, wo bei einigen Proben mehrere Banden amplifiziert wurden. Es ist nun möglich, dass nicht das richtige Transkript isoliert und analysiert wurde, welches für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich ist, oder dass der Phänotyp erst durch das Zusammenwirken mehrerer Transkripte entstanden ist.

### **4.2.2 Validierung verschiedener Methoden für das Phänotypenscreening von Tabakkeimlingen**

Um Mutanten zu identifizieren, die veränderte Eigenschaften aufweisen, können eine Vielzahl unterschiedlich angelegter Screenings durchgeführt werden.

Die Screeningmethoden mit einer mutagenisierten Population sind zumeist speziell auf das Ziel ausgerichtet. Für die Suche nach Genen, die beim Wasserhaushalt eine Rolle spielen, würden im Screening zum Beispiel Bedingungen für Trockenstress simuliert werden. Für die Untersuchung und Detektion möglichst vieler Ereignisse ist die Durchführung mehrerer Screenings nötig. In dieser Arbeit wurde versucht, eine gewisse Bandbreite an verschiedenen Screeningmethoden zu untersuchen, um zu ermitteln, welches für das Auffinden von Mutanten aus dem Aktivierungstaggung am effektivsten ist. Die Möglichkeit für das Auffinden von Mutanten ist dann am größten, wenn ein Screeningkriterium gewählt wird, bei dem eine Vielzahl von Genen involviert ist. Microarray-Experimente von *Arabidopsis thaliana* geben einen Eindruck von der Anzahl der betroffenen Gene, die bei einem bestimmten Stimulus oder unter bestimmten Bedingungen eine veränderte Expression aufweisen. Zum Beispiel wurden unter Salzstress in Spross und Wurzel bis zu 2427 Gene hoch reguliert und 1785 herunter reguliert (Kilian *et al.* 2007).

In dieser Arbeit wurden zwei Screenings durchgeführt, bei denen visuell nach morphologischen Veränderungen auf Keimlingsebene geschaut wurde. Bei drei weiteren Screenings wurde nach Phänotypen gesucht, die Toleranz gegenüber Abscisinsäure, 2,4-D und NaCl aufwiesen.

Die Screenings mit Abscisinsäure, 2,4-D oder NaCl im Medium brachten keine deutlichen Phänotypen hervor. Die Schwierigkeit liegt vermutlich darin, die geeigneten Bedingungen zu definieren. Sowohl die Konzentration als auch der Beobachtungszeitpunkt sind entscheidend. Die Zugabe von ABA, NaCl und 2,4-D führt nicht zum Absterben der Pflanzen, sondern lediglich zu verlangsamtem Wachstum. Die Konzentration muss nun so hoch gewählt werden, dass eine gewisse Variabilität innerhalb einer Population abgedeckt ist und auch geringe Schwankungen in den Umweltbedingungen kein abweichendes Wachstum ermöglichen, um dominante Mutanten eindeutig herausfiltern zu können. Auf der anderen Seite darf die gewählte Konzentration auch nicht so hoch sein, dass gar keine Pflanze, selbst mit dominanter Mutation, die Chance hat sich zu entwickeln. Im ABA-Screening zum Beispiel tauchten mehrere Linien auf, die eine höhere Toleranz als Wildtyp-Pflanzen zeigten, allerdings unterschieden sich hier die jeweilige Kontrollpopulation ADW nicht von der ADL-Population, die bis auf die letzte Kreuzung den gleichen genetischen Hintergrund aufwiesen. Hier handelt es sich entweder um eine Veränderung, die nicht von der Transkriptionsaktivierung herrührt oder um natürliche Schwankungen innerhalb einer Population.

Beim Screening mit NaCl wurden zunächst wenige Linien mit erhöhter Toleranz bei den ADL-Linien gegenüber den zugehörigen ADW Linien gefunden. Diese Abweichung beschränkte sich jedoch nur auf einen kurzen Zeitraum. Außerdem waren diese Abweichungen nicht reproduzierbar, so dass sich auch in diesem Screening die Mutanten nicht verlässlich identifizieren ließen.

Im visuellen Screening nach morphologischen Auffälligkeiten ließen sich die meisten phänotypisch veränderten Keimlinge detektieren. Bei der Population, die in Erdkultur untersucht wurde, konnten fast 40mal mehr Pflanzen mit fusionierten Kotyledonen gefunden werden, als in Wildtyppflanzen. Leider besitzt diese Population einen undefinierten genetischen Hintergrund. Zum Beispiel war hier das *Ds*-Element nicht wie bei den ADL-Linien mit einem Selektionsmarker getaggt. Es ist somit nicht klar, ob alle Komponenten des Systems in den Pflanzen vorliegen und dieses für die Veränderung verantwortlich ist. Dennoch bietet sich das Screening nach morphologisch auffälligen Keimlingen mit Anzucht in Erde an, da hier mit weniger Material- und Arbeitsaufwand eine



größere Anzahl an Pflanzen beobachtet werden kann. Nachteilig ist jedoch das Fehlen einer Selektionsmöglichkeit, um gleichzeitig zu verfolgen, dass die Komponenten des Aktivierungstaggings-Systems in der Pflanze vorliegen. Diese Analyse kann aber nachträglich zum Beispiel durch PCR erfolgen. Die Screeningpopulation könnte zwar mit Antibiotika besprüht werden, um eine Selektion zu ermöglichen, dies würde jedoch die Unterscheidung von Wachstumsmutanten und Antibiotika-sensitiven stark erschweren.

### **4.2.3 Die Anwendung des Aktivierungstaggings mit *Ac/Ds* und LhG4 zur Identifizierung und Analyse neuer Gene**

Die Experimente mit dem *Ac/Ds*-Aktivierungstaggings-System belegen, dass die Transkription aus dem *DspOp*-Element durch den Transkriptionsaktivator LhG4 prinzipiell gut funktioniert. Die GUS-Assays zeigen, dass die Expression von Genen benachbart zum *DspOp* stark erhöht ist und dass eine konzentrationsabhängige Regulation durch Zugabe von IPTG ins Medium durchgeführt werden kann (Abbildung 3.12, Seite 79). Auch wurde eine erhöhte Rate an phänotypisch auffälligen Pflanzen im Screening von Tabakkeimlingen gefunden, welche transponierte *Ds*-Elemente enthalten und in die der Transkriptionsaktivator eingekreuzt wurde. Des Weiteren wurden aus diesen auffälligen Pflanzen Transkripte isoliert, die aus dem *DspOp* herauslaufen. Prinzipiell ist es also möglich mit diesem System das Aktivierungstaggings durchzuführen.

Durch die Tatsache, die Stärke der Transkriptionsaktivierung mit IPTG zu regulieren, ergibt sich die Möglichkeit, die Phänotypen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu analysieren oder solche zu untersuchen, die zum Beispiel Wachstumsdefekte aufweisen. Dazu würde man zunächst die Anzucht mit IPTG durchführen, um die Aktivierung zu unterdrücken. Ab einem bestimmten Zeitpunkt würde dann das Wachstum ohne IPTG fortgesetzt, wodurch die Expression des getaggtten Gens einsetzt.

Beim Aktivierungstaggings können im Vergleich zur Insertionsmutagenese auch Gene isoliert werden, die zum Beispiel zu einer Genfamilie gehören und deren *knock-out* von den anderen Mitgliedern der Familie kompensiert würde und die somit bei der Insertionsmutagenese unentdeckt blieben. Ebenso ist der Einsatz des Aktivierungstaggings bei polyploiden Pflanzen, zu denen viele Nutzpflanzen gehören, effektiver, da auch hier der *knock-out* eines Allels in vielen Fällen keine Folgen hat, da redundante Gene oder Genduplikationen vorhanden sind (Adams und Wendel 2005). Ein wichtiger Vorteil der Nutzung von Transposons zum Aktivierungstaggings gegenüber T-DNA

ist, dass mit wenigen Primärtransformanten viele unabhängige Integrationsstellen erzeugt werden können. Zudem liegen die Integrationsorte der *Ac/Ds*-Transposons häufig in transkriptionsaktiven Regionen (Meissner *et al.* 2000). Auch dies wirkt sich gerade bei der Anwendung in Nutzpflanzen positiv aus, da diese meist große Genome besitzen und zusätzlich die Transformationsmethoden ineffizient und zeitaufwendig sind. Das in dieser Arbeit untersuchte Aktivierungstaggung-System bietet des Weiteren die Möglichkeit der Regulierbarkeit, um die Transkriptionsaktivierung der getaggtten Gene zu steuern. Damit eröffnet sich erstens eine erweiterte Möglichkeit der Funktionsanalyse der Gene, indem man die Expression nur in bestimmten Entwicklungsstadien hemmt oder zulässt.

Bisher konnten noch keine Pflanzen mit vererbbaaren Phänotypen durch das hier beschriebene Aktivierungstaggung-System detektiert werden. Es werden jedoch laufend weitere Screenings mit den erzeugten ADL/ADW-Linien durchgeführt. Da nicht nur Veränderungen im Keimlingsstadium auftreten können, werden zur Zeit einige Pflanzenlinien über den gesamten Entwicklungszyklus im Gewächshaus beobachtet. Aufgefallen ist hierbei ein Blütenphänotyp, der durch eine partielle Rosafärbung der normalerweise grünen Kelchblätter gekennzeichnet ist und durch intensiverer gefärbte Blütenblätter, was auf eine erhöhte Anthocyan-Biosynthese schließen lässt.

## 5 Zusammenfassung

Die seit über 50 Jahren bekannten und im Laufe der Jahre gut charakterisierten Mais *Ac*- und *Ds*-Transposonelemente lassen sich sinnvoll als Werkzeuge in der Molekularbiologie einsetzen. Die Transposition ist in vielen heterologen Wirtspflanzen gezeigt worden und *Ac/Ds*-Systeme wurden erfolgreich in Mutagenesesystemen zur Isolierung von Genen eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuartiges Aktivierungstaggung-System untersucht, bei dem das *Ac/Ds*-Transposonsystem mit einem System zur regulierten Transkriptionsaktivierung kombiniert wurde. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit, die mit dem *Ac/Ds*-System erschlossen wurde, ist die Markergeneliminierung bei Nutzpflanzen. Hierfür wurden Transformationsvektoren erstellt, die alle Komponenten für die Herstellung von transgenen Pflanzen ohne Markergene enthalten. Da ein möglicher Einsatz dieses Systems bei der Zuckerrübe vorgesehen ist, wurde in dieser Pflanze das Transpositionsverhalten von *Ac* und *Ds* untersucht.

Die Untersuchungen der Transposition in der Zuckerrübe wurden sowohl mit *hairy root* Linien als auch mit regenerierten transgenen Zuckerrüben durchgeführt. In beiden Ansätzen konnten an der Exzisionsstelle *footprints* detektiert werden, die einen Hinweis für eine stattgefundene Transposition darstellen. Alle zehn analysierten *footprints* wiesen eine Deletion eines Nukleotids auf, bei sechs wurde zusätzlich noch ein weiteres Nukleotid verändert. Die Entstehung der *footprints* lässt sich am Besten mit dem *hairpin model* erklären, bei dem die DNA-Enden nach erfolgter Exzision jeweils einen internen *loop* ausbilden. Nach Aufbrechen der *loop*-Struktur, findet die Ligation der beiden DNA-Enden statt. Das Aufbrechen der *loops* kann auch an anderer Position als bei der Bildung erfolgen, wodurch Nukleotide von den komplementären Strängen ausgetauscht werden können. Vor und nach dem Ringschluss sind die Enden Exonuklease-vermittelter Abbau ausgesetzt, wodurch die Deletion der Nukleotide zustande kommen könnte.

Im Vergleich zur Exzision wurden nur wenige intakte Integrationsereignisse der Transposonelemente gefunden. Lediglich in zwei Pflanzen wurden die Integrationsorte bestätigt und nur in einer findet sich die für die Transposition charakteristische 8bp Duplikation wieder. Es wurde keine Statistik für die Transpositionsfrequenz erstellt, aber die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die *Ac/Ds*-Transposition in der Zuckerrübe eher ineffizient abläuft.

Für die Markergeneliminierung in Nutzpflanzen wurde ein Vektorsystem konstruiert, bei

dem das Zielgen von den beiden *Ds*-Enden flankiert wird. Ein stabiles *Ac*-Element vermittelt die Transposition der *Ds*-Zielgen Kasse. Nach erfolgter Exzision wird ein *ihp*-Element aktiviert, welches über RNAi die Transposaseaktivität silencen kann, um in der Pflanze Sekundärtranspositionen zu verhindern. Durch Integration der *Ds*-Zielgen-Kasse an einen nicht mit der T-DNA *donor site* gekoppelten Lokus, kann in der Folgegeneration die T-DNA inklusive Markergen und *Ac* ausgekreuzt werden. Für die effiziente Anwendung zur Herstellung von transgenen Pflanzen kann das Zielgen mittels Gateway-Technologie einfach und schnell in den Vektor übertragen werden. Experimentell wurde *in planta* gezeigt, dass durch die *ihp*-Elemente die *Ac*-Transkriptmenge stark reduziert wird und somit die Transposition unterbunden werden sollte. Auch das Einbringen eines Zielgens in den Vektor durch die Gateway-Rekombination wurde simuliert. Das fertige Vektorsystem steht für die Anwendung in Pflanzen zur Verfügung.

Bei dem untersuchten Aktivierungstaggung-System befindet sich zwischen den *Ds*-Enden eine Promotor-Operator Sequenz. Nach erfolgter Transposition und Einkreuzen des Transkriptionsaktivators LhG4, bindet dieser an den Operator und initiiert die Transkription aus dem *Ds*-Element heraus in die dem Integrationsort benachbarte Region. Der Transkriptionsaktivator kann zudem chemisch reguliert werden. Durch IPTG wird die Transkriptionsrate herabgesetzt. Die Aktivierung der Genexpression mit LhG4 sowie die konzentrationsabhängige Regulation durch IPTG wurde durch GUS-Reportergenaktivität in Tabakkeimlingen bestätigt.

In mehreren Screenings von Tabakkeimlingen, in die alle Komponenten des Aktivierungstaggung-Systems eingebracht wurden, konnten morphologisch auffällige Pflanzen detektiert werden. Aus vier Pflanzen, die fusionierte Kotyledonen nach der Keimung aufwiesen, wurden aktivierte Transkripte isoliert, die aus dem *Ds*-Element heraus in die benachbarte genomische Region reichen. Bei drei Transkripten wurde jeweils eine Sequenzhomologie zu Abschnitten einer Pektinmethylesterase, einem Aminosäuretransporter und einem Gß-ähnlichem Protein gefunden. Ein Zusammenhang zwischen der durch LhG4 verursachten erhöhten Expression dieser Abschnitte und dem Phänotyp wäre denkbar. Jedoch war die Rekonstruktion des Phänotyps mit den erhaltenen Transkripten in Tabakpflanzen erfolglos. Allerdings werden laufend weitere phänotypische Screenings mit dem Aktivierungstaggung-System durchgeführt.

## 6 Literatur

- Adams KL, Wendel JF** (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8** (2): 135–141.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25** (17): 3389–3402.
- Ayliffe MA, Pallotta M, Langridge P, Pryor AJ.** (2007) A barley activation tagging system. *Plant Mol. Biol.* **64** (3): 329–347.
- Belzile F, Yoder JI** (1992) Pattern of somatic transposition in a high copy Ac tomato line. *Plant J.* **2** (2): 173–179.
- Bennetzen JL** (2000) Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol. Biol.* **42** (1): 251–269.
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** (6): 1513–1523.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (72): 248–254.
- Breitler J, Meynard D, Van Boxtel J, Royer M, Bonnot F, Cambillau L, Guiderdoni E** (2004) A novel two T-DNA binary vector allows efficient generation of marker-free transgenic plants in three elite cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Transgenic Res.* **13** (3): 271–287.
- Chen J, Greenblatt IM, Dellaporta SL** (1992) Molecular analysis of Ac transposition and DNA replication. *Genetics* **130** (3): 665–676.
- Chen J, Ullah H, Temple B, Liang J, Guo J, Alonso JM, Ecker JR, Jones AM** (2006) RACK1 mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **57** (11): 2697–2708.
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16** (6): 735–743.
- Cotsaftis O, Sallaud C, Breitler JC, Meynard D, Greco R, Pereira A, Guiderdoni E** (2002) Transposon-mediated generation of T-DNA- and marker-free rice plants expressing a Bt endotoxin gene. *Mol. Breeding* **10** (3): 165–180.
- Earp DJ, Lowe B, Baker B** (1990) Amplification of genomic sequences flanking transposable elements in host and heterologous plants: a tool for transposon tagging and genome characterization. *Nucleic Acids Res.* **18** (11): 3271–3279.
- Enoki H, Izawa T, Kawahara M, Komatsu M, Koh S, Kyojuka J, Shimamoto K** (1999) Ac as a tool for the functional genomics of rice. *Plant J.* **19** (5): 605–613.
- Fedoroff N, Wessler S, Shure M** (1983) Isolation of the transposable maize controlling elements Ac and Ds. *Cell* **35** (1): 235–242.
- Filipecki M, Malepszy S** (2006) Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *J. Appl. Genet.* **47** (4): 277–286.
- Fire A** (1999) RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* **15** (9): 358–363.

- Gateway® Vector Conversion System** Protocol (2004) Version A. Invitrogen.
- Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz - GenTG)** Stand: BGBl. I 2008, Nr. 50, S. 2121-2160, ausgegeben am 04.11.2008.
- Gleave AP** (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol. Biol.* **20** (6): 1203–1207.
- Goldsbrough A, Lastrella C, Yoder J** (1993) Transposition mediated repositioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Nat. Biotechnol.* **11** (11): 1286–1292.
- Gorbunova V, Levy AA** (2000) Analysis of extrachromosomal Ac/Ds transposable elements. *Genetics* **155** (1): 349–359.
- Hall TA** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* (41): 95–98.
- Hare PD, Chua N** (2002) Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* **20** (6): 575–580.
- Hartleben E** (2001) Funktionelle Analyse eines Ds-Transposons für die spontane transkriptionelle Aktivierung von Pflanzengenen. Studienarbeit. Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA** (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* **10** (11): 1788–1795.
- Hausmann L, Toepfer R** (1999) Development of Plasmid Vectors. In: Brauer, D., Roebbelen, G. and Toepfer R (Eds.); Bioingenieureng of custom-tailored rape varieties; GPZ e. V., Göttingen. 155-172.
- Hehl R** (1994) Transposon tagging in heterologous host plants. *Trends Genet.* **10** (11): 385–386.
- Hehl R, Baker B** (1990) Properties of the maize transposable element Activator in transgenic tobacco plants: a versatile inter-species genetic tool. *Plant Cell* **2** (8): 709–721.
- Heinlein M, Brattig T, Kunze R** (1994) In vivo aggregation of maize Activator (Ac) transposase in nuclei of maize endosperm and Petunia protoplasts. *Plant J.* **5** (5): 705–714.
- Hennig W** (1995) Genetik. (Lehrbuch) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hohn B, Levy AA, Puchta H** (2001) Elimination of selection markers from transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12** (2): 139–143.
- Honma MA, Baker BJ, Waddell CS** (1993) High-frequency germinal transposition of DsALS in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90** (13): 6242–6246.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rofers SG, Fraley RT** (1985) A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. *Science* **227** (4691): 1229–1231.
- Huang S, Gilbertson LA, Adams TH, Malloy KP, Reisenbigler EK, Birr DH, Snyder MW, Zhang Q, Luethy MH** (2004) Generation of marker-free transgenic maize by regular two-border Agrobacterium transformation vectors. *Transgenic Res.* **13** (5): 451–461.

- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6** (13): 3901–3907.
- Jia H, Pang Y, Chen X, Fang R** (2006) Removal of the selectable marker gene from transgenic tobacco plants by expression of Cre recombinase from a tobacco mosaic virus vector through agroinfection. *Transgenic Res.* **15** (3): 375–384.
- Jiang S, Bachmann D, La H, Ma Z, Venkatesh PN, Ramamoorthy R, Ramachandran S** (2007) Ds insertion mutagenesis as an efficient tool to produce diverse variations for rice breeding. *Plant Mol. Biol.* **65** (4): 385–402.
- Jones RN** (2005) McClintock's controlling elements: the full story. *Cytogenet. Genome Res.* **109** (1-3): 90–103.
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weinl S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K** (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* **50** (2): 347–363.
- Knapp S, Coupland G, Uhrig H, Starlinger P, Salamini F** (1988) Transposition of the maize transposable element Ac in *Solanum tuberosum*. *Mol. Gen. Genet.* **213** (2-3): 285–290.
- Köhler U, Liaud MF, Mendel RR, Cerff R, Hehl R** (1995) The maize GapC4 promoter confers anaerobic reporter gene expression and shows homology to the maize anthocyanin regulatory locus C1. *Plant Mol. Biol.* **29** (6): 1293–1298.
- Kolesnik T, Szeverenyi I, Bachmann D, Kumar CS, Jiang S, Ramamoorthy R, Cai M, Ma ZG, Sundaresan V, Ramachandran S** (2004) Establishing an efficient Ac/Ds tagging system in rice: large-scale analysis of Ds flanking sequences. *Plant J.* **37** (2): 301–314.
- Koprek T, McElroy D, Louwerse J, Williams-Carrier R, Lemaux PG** (2000) An efficient method for dispersing Ds elements in the barley genome as a tool for determining gene function. *Plant J.* **24** (2): 253–263.
- Krishnaswamy L, Zhang J, Peterson T** (2008) Reversed end Ds element: a novel tool for chromosome engineering in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **68** (4-5): 399–411.
- Kunze R, Weil CF** (2002) The hAT and CACTA superfamilies of plant transposons. In: NL Craig, R Craigie, M Gellert, AM Lambowitz, eds, *Mobile DNA II*, ASM Press, Washington): 565–610.
- Kusaba M** (2004) RNA interference in crop plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15** (2): 139–143.
- Laufs J, Wirtz U, Kammann M, Matzeit V, Schaefer S, Schell J, Czernilofsky AP, Baker B, Gronenborn B** (1990) Wheat dwarf virus Ac/Ds vectors: expression and excision of transposable elements introduced into various cereals by a viral replicon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87** (19): 7752–7756.
- Lee Y, Foster J, Chen J, Voll LM, Weber APM, Tegeder M** (2007) AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis*. *Plant J.* **50** (2): 305–319.
- Lehming N, Sartorius J, Niemöller M, Genenger G, v Wilcken-Bergmann B, Müller-Hill B** (1987) The interaction of the recognition helix of lac repressor with lac operator. *EMBO J.* **6** (10): 3145–3153.

- Lewis RS, Linger LR, Wolff MF, Wernsman EA** (2007) The negative influence of N-mediated TMV resistance on yield in tobacco: linkage drag versus pleiotropy. *Theor. Appl. Genet.* **115** (2): 169–178.
- Lisson R** (2002) Untersuchungen zur Transposition der Mais Ac/Ds-Elemente in der Zuckerrübe. Diplomarbeit. Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Machens F** (2007) Untersuchungen zur Transposition von Ac/Ds Elementen in der Zuckerrübe. Studienarbeit. Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Meissner R, Chague V, Zhu Q, Emmanuel E, Elkind Y, Levy AA** (2000) Technical advance: a high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *Plant J.* **22** (3): 265–274.
- Micheli F** (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* **6** (9): 414–419.
- Miki B, McHugh S** (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J. Biotechnol.* **107** (3): 193–232.
- Miller M, Tagliani L, Wang N, Berka B, Bidney D, Zhao Z** (2002) High efficiency transgene segregation in co-transformed maize plants using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary system. *Transgenic Res.* **11** (4): 381–396.
- Moore I, Gälweiler L, Grosskopf D, Schell J, Palme K** (1998) A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** (1): 376–381.
- Moore I, Samalova M, Kurup S** (2006) Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *Plant J.* **45** (4): 651–683.
- Nagel R, Masel AE, Birch RG, Manners JM** (1990) Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67** (3): 325–328.
- Nucleobond® AX 100/500** Protocol (2000). Macherey-Nagel.
- NucleoSpin® Extract 2 in 1** Protocol (2001). Macherey-Nagel.
- NucleoSpin® Plant II** Protokoll (2006) Rev. 01, Macherey-Nagel.
- Okumoto S, Schmidt R, Tegeder M, Fischer WN, Rentsch D, Frommer WB, Koch W** (2002) High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277** (47): 45338–45346.
- Olszewski NE, Martin FB, Ausubel FM** (1988) Specialized binary vector for plant transformation: expression of the *Arabidopsis thaliana* AHAS gene in *Nicotiana tabacum*. *Nucleic Acids Res.* **16** (22): 10765–10782.
- Original TA Cloning® Kit** Handbook (2002). Version S, Invitrogen BV
- Ow DW** (2007) GM maize from site-specific recombination technology, what next? *Curr. Opin. Biotechnol.* **18** (2): 115–120.
- Pereira A** (2000) A transgenic perspective on plant functional genomics. *Transgenic Res.* **9** (4-5): 245-260; discussion 243.
- Peterson DG, Stack SM, Price HJ, Johnston JS** (1996) DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (*Lycopersicon esculentum*) pachytene chromosomes. *Genome* **39** (1): 77–82.



- Pohlman RF, Fedoroff NV, Messing J** (1984) The nucleotide sequence of the maize controlling element Activator. *Cell* **37** (2): 635–643.
- Puchta H** (2003) Towards the ideal GMP: homologous recombination and marker gene excision. *J. Plant Physiol.* **160** (7): 743–754.
- Qu S, Desai A, Wing R, Sundareshan V** (2008) A versatile transposon-based activation tag vector system for functional genomics in cereals and other monocot plants. *Plant Physiol.* **146** (1): 189–199.
- Ramessar K, Peremarti A, Gómez-Galera S, Naqvi S, Moralejo M, Muñoz P, Capell T, Christou P** (2007) Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics. *Transgenic Res.* **16** (3): 261–280.
- REDExtract-N-Amp™Plant PCR Kit** Technical Bulletin (2000). Sigma Aldrich.
- Reintanz B** (1997) Funktionelle Charakterisierung der Kaliumkanal  $\alpha$ -Untereinheit AtKC1 aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Universität zu Köln, Köln.
- Ringleb M** (2008) Analyse von Integrationsstellen des Mais-Transposons Ac in der Zuckerrübe. Bachelorarbeit. Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Rommens CM, van Haaren MJ, Buchel AS, Mol JN, van Tunen AJ, Nijkamp HJ, Hille J** (1992) Transactivation of Ds by Ac-transposase gene fusions in tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **231** (3): 433–441.
- Saedler H, Nevers P** (1985) Transposition in plants: a molecular model. *EMBO J.* **4** (3): 585–590.
- Schnettler K** (2003) Untersuchung von Ac und Ds Integrationsstellen im Zuckerrüben genom. Diplomarbeit. Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Scholz S, Lörz H, Lütticke S** (2001) Transposition of the maize transposable element Ac in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol. Gen. Genet.* **264** (5): 653–661.
- Scutt CP, Zubko E, Meyer P** (2002) Techniques for the removal of marker genes from transgenic plants. *Biochimie* **84** (11): 1119–1126.
- Shewry PR, Jones HD, Halford NG** (2008) Plant biotechnology: transgenic crops. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **111** (-): 149–186.
- Shimamoto K, Miyazaki C, Hashimoto H, Izawa T, Itoh K, Terada R, Inagaki Y, Iida S** (1993) Trans-activation and stable integration of the maize transposable element Ds cotransfected with the Ac transposase gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* **239** (3): 354–360.
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM** (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407** (6802): 319–320.
- Stahl DJ, Kloos DU, Hehl R** (2004) A sugar beet chlorophyll a/b binding protein promoter void of G-box like elements confers strong and leaf specific reporter gene expression in transgenic sugar beet. *BMC Biotechnol.* **5** (4): 31.
- Streitner C** (2003) Analyse transponierter Ds-Elemente in phänotypisch auffälligen Tabakpflanzen. Diplomarbeit. Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Sundar IK, Sakthivel N** (2008) Advances in selectable marker genes for plant transformation. *J. Plant Physiol.* **165** (16): 1698–1716.

- Susi P, Hohkuri M, Wahlroos T, Kilby NJ** (2004) Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Mol. Biol.* **54** (2): 157–174.
- Suzuki Y, Uemura S, Saito Y, Murofushi N, Schmitz G, Theres K, Yamaguchi I** (2001) A novel transposon tagging element for obtaining gain-of-function mutants based on a self-stabilizing Ac derivative. *Plant Mol. Biol.* **45** (2): 123–131.
- Takumi S** (1996) Hygromycin-resistant calli generated by activation and excision of maize Ac/Ds transposable elements in diploid and hexaploid wheat cultured cell lines. *Genome* **39** (6): 1169–1175.
- Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ** (1988) A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* **16** (16): 8186.
- Tzfira T, Citovsky V** (2006) Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17** (2): 147–154.
- Uphoff H** (1994) Erstellung einer genetischen Karte bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) mit Hilfe von RAPD-Markern. Dissertation. Universität Hannover, Hannover.
- van Deblaere R, Bytebier B., Greve H., Deboeck F., Schell J., Montagu M., Leemans J.** (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13** (13): 4777–4788.
- van den Eede G, Aarts H, Buhk H, Corthier G, Flint HJ, Hammes W, Jacobsen B, Midtvedt T, van der Vossen J, von Wright A, Wackernagel W, Wilcks A** (2004) The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food Chem. Toxicol.* **42** (7): 1127–1156.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM** (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* **27** (6): 581–590.
- Wirtz U** (1989) Kombination des Maistransposons Activator bzw. Dissociation mit dem Genom des Weizenzwergwuchsvirus und Studien homologer Rekombination in *Nicotiana tabacum*. Universität zu Köln, Köln.
- Wirtz U, Osborne B, Baker B** (1997) Ds excision from extrachromosomal geminivirus vector DNA is coupled to vector DNA replication in maize. *Plant J.* **11** (1): 125–135.
- Yoder JI, Goldsbrough AP** (1994) Transformation Systems for Generating Marker-Free Transgenic Plants. *Nat. Biotechnol.* **12** (3): 263–267.
- Yu J, Marshall K, Yamaguchi M, Haber JE, Weil CF** (2004) Microhomology-dependent end joining and repair of transposon-induced DNA hairpins by host factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **24** (3): 1351–1364.
- Zhang W, Subbarao S, Addae P, Shen A, Armstrong C, Peschke V, Gilbertson L** (2003) Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Theor. Appl. Genet.* **107** (7): 1157–1168.

## 7 Anhang

### 7.1 Sequenzen

Ds-Transkripte aus dem Aktivierungstaging in Tabak: (Fett:Primersequenzen; Unterstrichen:Ds-Ende)

Transkript 1:

**cggtccggttttcggttttacctcgggttcgaaatcgatcgggataaaaactaacaaaatcggttatacgataacgggtcggtacgggattttccatcctacttt**  
catccctgcatggagtggtgactttcgcgctgaaaacattgtactatggagaatactgaacactggctcggtcgtaactgcaaatagggttaaagg  
 gtggttatcggttattacaagtgtgctgagggatccaaattcacacctgctaatttcattgctggaaattcttggtgccagccaccaacgtgccattcactg  
 tggctttgatttgtttaatctataatcgactttgtgtattactatataaccgattgaattgtcaattataagtagcatcaacataataaattgttgctcaa  
 aaagaaatgtgaaattgagcaactggctgtattgtgtatcctccttaattgttgattatcaattcttctgaattagcacgaagaattgtggaataagaat  
 catccttt**ccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa**

Transkript 200:

**cggtccggttttcggttttacctcgggttcgaaatcgatcgggataaaaactaacaaaatcggttatacgataacgggtcggtacgggattttccatcctacttt**  
catccctgttgcgatccaactatggattcggaattcgacggcttcagtagctgtccaactctatgtgtatcatctgtccgaaaaattaacacgata  
 gaacgagtagatatacatattcataattcattcttcg**ccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa**

Transkript 325:

**cggtccggttttcggttttacctcgggttcgaaatcgatcgggataaaaactaacaaaatcggttatacgataacgggtcggtacgggattttccatcctacttt**  
catccctgttgaaacgaaaacaacacaatcgtaataatttttacactgtcaataatgcatagaattcgtagcgagatgggaacgaacagcatccatag  
 gtgtagttgcgagagccatcagggcgcgataacagtcagcaagaaggagagaagtgaaccaagttagactgagaaagcaacgagagcaactg  
 gtctgctatccatccaactgtgctgtagccatgccaaagataacactcctgatcctatcaccgctgttatgatatgggactgtagtcaataaccgttct  
 gtaattcacaaaattaattataatcattttagt**caaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa**

Transkript 364:

**cggtccggttttcggttttacctcgggttcgaaatcgatcgggataaaaactaacaaaatcggttatacgataacgggtcggtacgggattttccatcctacttt**  
catccctgtgcacatgtggtgtcacttcttttgggtggaagcatttttctgatgctaattgttcaaatgtcttgcaaatgataaatttagtacgtgctaag  
 caggaaagataataattttctataggttttaagtttccaagtcataacttctactaaagcgtgcatcagatggaccgaatttttatgtgtattcaagtatt  
 ctgagtgaggaaatacattatagtggatctgacatcaatgcactcaattggcagatcatatactgcacctgttgagctggagtgctgatggaagtacactttt  
 cgggtgatacacagatggttgattagatgaggaattggcggttattaggaaagagcatctaggggagccatttggccataatgattttaaggcatttat  
 attgctaataatcttgaaataggatttttgattctccctgttttcatggtctcgaggccctcaactgtttcagtttggaattcttattattttgtccatgaatatctt  
 gctataaatntaagttgttgc**gtgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa**

Integrationsorte von Ac in der Zuckerrübe: (Fett:Primersequenzen; Schattig:8bp Duplikation; II:Ac Integrationsort; Klammern:Deletierte Nukleotide im IPCR-Fragment. Der Integrationsort kann vor, zwischen oder hinter den Nukleotiden liegen)

Integrationsort IPCR1R9:

**ggtttaacgcttcagacattc**tttctattcataataacaataacatataatcatgtaattactttgtcacaggaagctttagatactatatgatagaaagtggaaat  
 tgcactgcagtggtgcttcttattaatataatctgtcatagctgtcagtggtgcagtttgcaattcctcaaatctgaacccggaagatcagaagagtttagag  
 acttgactgaatgaagcatatttctactcaaggtttgttcttttctattatgttcttattctcaaatctaaaaaatgtttcatat**atgcatg**llaatgtgagca  
 gaatgtgtgggaactggagttcaaaactgtttggaatagcattgctagcatcgggtcagagctcgacaataactggaacatatgct**ggccaatatgtc**  
**atgcaggta**



Vektorkonstrukt pADi4R für die Markergeneliminierung: Der schematische Aufbau des Konstrukts ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

RB  
 35S-Promotor  
 ACst  
 aggccttccgacgtttgggtggtgaacagaagtcattatcgacggaatgccagcactcccaggggaaccctgtggtggcatgcacatacaa  
 atggacgaacggataaacctttcacgcccttttaatatccgattattctaataaacgctctttctcttaggttaccgcgaatatatcctgtcaaact  
 gatagtttaaaccgaaggcgggaaacgacaatctgatcggtaccggggccaagatctggcccttaaggcctgtgcacggtatcgagatctcggt  
 ccgctctagggg gatctcctttgccccagagatcacaatggacgacttctctatctctacgatctagttaggaagttcgacggagaaggtgacgat  
 accatgttaccactgataatgagaagattagcctttcaatttcagaaagaatgtaacccacagatggttagagaggcttacgcagcaggtctcat  
 caagacgatctacccgagcaataatctccaggagatcaaataccttcccaagaaggttaaagatgcagtcaaaagattcaggactaacgtcatca  
 agaacacagagaaagatatatttcaagatcagaagtactattccagatggacgattcaaggcttgcttcacaaaccaaggcaagtaatagaga  
 ttggagctctaaaaaggtagtcccactgaatcaaaggccatggagtcacaagattcaaatagaggacctaacagaactcgccgtaaagactggc  
 gaacagttcatacagagtctttacgactcaatgacaagaagaaaatcttcgtaacatggtggagcagcacacactgtctactccaaaaatatca  
 aagatacagtctcagaagaccaaagggaattgagactttcaacaaagggttaatatccgaaacctctcgattccattgccagctatctgtca  
 ctttattgtgaagatagtgaaaaggaaggtggctctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggccatcgtgaagatgcctctgccgacagt  
 ggtcccaaagatggacccccaccacgaggagcatcgtgaaaaagaagacgttcaaccacgtctcaagcaagtggattgatgtgataaca  
 ttggtggagcagcacacactgtctactccaaaaatatcaagatacagctcagaagaccaaagggaattgagactttcaacaaagggttaatat  
 ccggaaacctctcgattccattgccagctatctgtcactttattgtgaagatagtgaaaaggaaggtggctctacaaatgccatcattgcgata  
 aaggaaaaggccatcgtgaagatgcctctgccgacagtggcccaaagatggacccccaccacgaggagcatcgtgaaaaagaagacgttc  
 caaccacgtctcaagcaagtggattgatgtgatatctccactgacgtcagggatgacgcacaaatccactatccttcgcaagaccttctctatat  
 aaggaagttcatttcatttgagaggac gacctgcagccgggggatcggggccaagatctgtgaacacctgtgtccagggtctgtctccac  
 ttccggttagccggtacgactccattctcagatgacgcctccggttgaaataatcctccctcaggctcagccataagattggccaagttgatgtcta  
 ccacaagagcgccttctactcgaaaaaaatccgtattctctgcatatgctcaaggatatattagaaaaacagtagcaatagcattagcattacta  
 attggttagattgggaagcatcatattgactgtagaataatacgaataatctgtttataacaggggtgaaaagaaaagctgaagcctctctagtcg  
 gattcagaatgtacgtgcacgtgcgctgggcatggatgtggccgcacatcaccatcatcatcaacagctgaggccgagaggcattttatcagagt  
 gtaagcagtagtaatgcaaatggtacagctacagatccgagtcagaatgatatggctattgttcatgaaccacaaccacaaccacaacc  
 agaaccacaaccacagccacaacctgaaccgaagaagaagcaccacagaagaggggcaaagaagtgcacatcggtgatgtggcagcatttc  
 accaagaaggaaattgaatggaggtcgatggaaagaaatcgttcaggtatggggacattgcaacttcttaattgcaaggctaagtatagggt  
 gagggatcatgtgaacaagcggatttcgaaatcacttgagaacatcacatagtttagttaaggctagttgtctaaaaagtgaaggatcatg  
 gcaaagacataaatctcattgagcctataagtacgatgaagtggtagcctaaagaagcttcatttggcaataatcatgcatgaatatcctttcaatatt  
 gtgaacatgagtactttgtgagttgttaagtctctgcgccctcactttcaataaagctccggtgactgctagaaaatatatcatggattgtatttga  
 agaaaaagaaaagttgatggaaaactaaaagatgttcagctcgccttcagtacaactatggatatgtggacatctgtcaaaataagtcatacatgt  
 gtgtcaccatccattggattgatgatgattggtgtctcaaaaaagaattgttggtttttcatgttgaggcgccacactggccaaagggtatcaca  
 acctcactgcaatcatggttaagtgaacattgagaaaaaattgttgccctgtctttgataatgctagtcaaatgaagtagctgtgcacgatataatt  
 gaggattgcaggacactgattcaaatctagttgtgatggtgtcttcttcatgtgaggtgtgctgtcacatactgaactggttgcaaaggatggcttg  
 ctgaattgcaggaacaattgagaaaatcaaagcgattgttctgtgtaaaatcttctccttgcagtggaagaactaatgaagtgtgctagtgaatg  
 gacttgataaatctaaaggatctcatatgatgtctcaactagatggaattcaacctatttgatgttgaggatgccttatattataagcctgcactaata  
 aggccttaaaacagtgatctcgaggtatgtttgtctcaattgtgtacatgtcatcattataaattctcaattaatcaaatgtcaattattgtaggtacgat  
 gcaattgtctaaagccgaggagtgaagatggcattaactcttttaagtgttgagaagttttgatctcactgaactcctatctggtactcaatattc  
 cactgcaattttttacaagggttctgtgagataaaggattgattgaccaatggtgtgtcatgaaaaattgtcattaggagaatggccgttgcaat  
 gagtgaaaagtttgagaaatattgaaagtgtctaattgtcactagctgtagcatgcttctgaccctaggtacaagaaaatattgattgagttctata  
 tgaaaaaatttcatggtgattcatacaaagttcatgtagatgactttgttagggcattagaaaattgtatcaattctattctagttgtagctcttcagctccaa

agacaaagacaactactaatgatagatggatgatacctgatggaaaatgaagatgatgaattcaaaactatttgcagtgagtgaggattatgatc  
 aagtagagtc aaatgaattggataaatatgtctgaacccctttgaagcatagtggtcagtttgatatttatcatgggtggagggaagggttcaga  
 atatctattctcacccaaattgcaagggtatgtctagcaatacaagtgcaactgttgctctgagctgcgttcagtgctgggtgctgtgttgatcctt  
 accgcaatcgtcttggtcggagattgttgaagctttgatatgcacaaaagattgggtagcagcatctagaaaaggatgaatgcataatgttataatga  
 agttccaattatagttattcaacaattatttacttatattgatgcataattgtgtcattcaagggtctacatatttccaacaatgattggatctcgaggtgct  
 agactctgtattgtctgctgaacaaatcatgagaatcatatggatgaggtatttaaagattatttactctgcatgggctattaattgctatttact  
 actgtttgatgcagggctgttgctgtgcctgtttgatgcagtcgcctgtgcccagccgtgttatactccctgcatggctggcattaacagattttga  
 tctactgcatgcgcctgtgctgctgtttgatggctgctagctgctagctgttaggctcccagctgttaggcgctagctgctagctgctagctcccagc  
 cgtgttagttcacagattcatgttctctatatgtatttattatactccctgcatatcaattcatgttctctatatgtatttattatccaaaactgactattttgtg  
 attaacaggatgaagacgcaatagaattttctaagaataatgaagatgtagcaagtggtcctctccatgagcaatgtgtcttatgtttgttgacagatg  
 agccttggtgtaatagttatgcagctaaagtatccagatgtgagcaagtgattatgaatatgttttaaactttatattgtgcatgtgtgctagtagact  
 atatggcttctatgttagccaagagcccaagacttatcacttatgtgtacattaaactatgtgtgctccagatttatggattttatctatgtttaattaaga  
 ctgtgtttacaatttttatattgttttaagtttgaatatgtttcatgtgtgattttaccgaacaaaataccgggtcccgtccgatttcgacttaaccgga  
 ccggatcgtatcggtttcgattaccgtatttatcccgttcgtttcgttaccgggtatatcccgtttcgttccgcccgaagttaaataatgaaaatgaaaac  
 ggtagaggtattttaccgaccgttaccgaccgtttcatc tgagttcagagcaagagcatgtatagcactaaactgtcaagcaacaggaaattgggtga  
 gattacattatgaagacagcctaatacagcccaaaaatccagttactgaccatcaaaaacatacacaggcagaaaagtccacatgcttttctctttttt  
 gaaatattccagagtcacaatttgcatgctgctattgcttaaagcaatgaagcaatggcttctactaacatgtaagggtgaatgagcttaatttcagtaa  
 attaaaattgtgaactacctggtgtgagaaatgacacagacacccttccatctgtctctgtttgacacacacttccccgtgcccgtgcaggtgcag  
 tctagaggatccactagtggtacgagctgctgcagcggccgctcgacgaatttaattccaatcccacaaaaatctgagcttaacagcacagttgctc  
 ctctcagagcagaatcgggtattcaacacccctcatatcaactactacgttgtgtataacgggtccacatgcccgttatatacagtagactgggtgtgacaa  
 agggcggaacaaacggcgttcccggagttgcacacaagaaatttgccactattacagaggcaagagcagcagctgacgcgtacacaacaagtc  
 agcaaacagacaggttgaactcatcccaaaggagaagctcaactcaagcccaagagcttgcctaaggccctaacaagcccaccaaagcaa  
 aaagccactggctcacgctaggaacaaaaggcccagcagtgatccagcccaaaagagatctccttggcccggagattacaatggacgattt  
 cctctatctttacgatctaggaaggaagttcgaaggtgaaggtgacgacatattgaccactgataatgagaaggttagcctcttcaatttcagaaa  
 gaatgctgaccacagatggttagagaggcctacgcagcaggtctcatcaagacgatctacccgagtaacaatctccaggagatcaaataccttc  
 ccaagaaggttaaagatgcagtcaaaagattcaggactaattgcatcaagaacacagagaaaagacatatttctcaagatcagaagtactattcca  
 gtatggacgattcaaggcttgcctcataaaccaaggcaagtaatagagattggagctctaaaaaggtagttcctactgaatcaggccatgcatgg  
 agtctaagattcaaatcgaggatctaacagaactcgccgtgaagactggcgaacagttcatacagagcttttacgactcaatgacaagaagaaaa  
 tctctgtaacatggtggagcagcagactctggtctactccaaaatgtcaagatacagctctcagaagaccaaagggtattgagacttttcaaca  
 aaggataatttcgggaaacctctcgattccattgccagctatctgtcacttcatcgaaaggacagtagaaaaggaaggtggctcctacaaatgc  
 catcattgcgataaaggaaaggctatcattcaagatctctgcccagcagtggtccaaagatggacccccaccacgaggagcatcgtggaaaa  
 agaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggtgattgatgtgacatctccactgacgtaagggtgacgcacaatcccactatcttcgaaga  
 cccttctctatataaggaagttcatttcatttgagaggacacg ctcgagggtcatggttacttctaatcgatggatcagcttcgacg cagggatga  
aagtaggatgggaaaatcccgtaccgaccgttatcgtataaccgattttgtagttttatcccgatcgatttcgaacccgaggtaaaaaacgaaaacg  
gaacggaaacgggatatacaaaacggtaaacggaaacggaaacggtagagctagttcccgaccgttaccgggatcccgttttaacgggat  
gatcccgtttcgttaccgtattttctaattcgggatgactgcaaatggag tg atcaaccactttgtacaagaaagctgaacgagaaacgtaaatga  
tataaatcaatatattaaattagattttgcataaaaaacagactacataactgtaaaacacaacatatccagtcactatggtgcacctgcagact  
ggctgtgtataaggagcctgacatttatattcccagaacatcaggttaattggcgtttttgatgtcattttcgcggtggctgagatcagccacttctcccc  
gataacggagaccggcacactggccatatcgggtggtcatcatgcgcagctttcatccccgatatgcaccaccgggttaaagttcacgggagacttt  
atctgacagcagacgtgcactggccagggggatcaccatccgtcgcggggcggtgtcaataatatcactctgtacatccacaacagacgataac  
ggctctcttttatagggtgaaacctaaactgcatttcaccagcccctgttctgtcagcaaaagagccgttcatttcaataaacggggcgacctcagc

35S-Promotor

Dsi1

RfB-Kassette

## Intron

ihp400(antisense)

---ocs-Term

tctggagaaaaatagagagagatagattgtagagagagactgggtattttgcggac tagcttaggaggggagcagagaactgaaagcatctt  
cctgttagtctttctcgtagacttcaaacttatacttgatgccttttctcctggacctcagagaggacgcctgggtattctgggagaagtttatattccc  
caaatcaatttctgggaaaaacgtgtcactttcaaattcctgcatgatcctgtcacaaagagctgaggtggcctgggtgattcatggcttctggtaaa  
cagaactgcctccgactatcaaaccatgtctactttacttgccaattccggtgttcaataagtcttaaggcatcatcaaactttggcaagaaaatga  
gctcctcgtgggtggttcttgagttctactgagaactatattaattctgtcctttaaggctgattctctcaggaatggagaaccagggtttctaccata  
atcaccagattctgtttaccttccactgaagaggtgtgggtcattcttgaagtacttgaactcgttctgagcggaggccagggtcgggtcctcgttctgc  
caatccccatattttgggacacggcgacgatgcagttcaatggcgaacctgatggcaaattggcc ctcgaggtccttccaaatgaaatgaactt  
ccttatatagaggaagggcttgcgaaggatagtggtgattgtgcgtcatccctacgtcagtgagatatcacatcaatccacttgcttgaagacgtgg  
ttggaacgtcttctttccacgatgttctcgtgggtgggggtccatcttgggaccactgtcggtagaggcatcttgaacgatagcctttcttatcgcaa  
tgatggcattttagaagccatcttcttttactgtcctttcgatgaagtacagatagctgggcaatggaatccgaggagggttcccgatattaccctt  
gttgaagagtcctcaatagccctctgggtctctgagactgtatcttgaattcttggagtagacgagagtgctgtctccaccatgtt ctagagccgatcgt  
gaagtttctcatctaagccccatttgacgtgaatgtagacacgtcgaaataaagatttccgaattagaataattgtttattgctttcgctataaatacg  
acggatcgtaattgtcgtttatcaaaatgtactttcatttataataacgtcgggacatctacattttgaattgaaaaaaattggaattactcttctttt  
ctccatattgaccatcatactcattgctgatccatgtagatttccggacatgaagccatttacaattgaatatatcct



## 7.2 PCR-Nachweis von *Ac*, *Ds* und *donor site* in den Zuckerrübenlinien 001R und 002R

Bezeichnung der Pflanze	Abstammung (Kreuzungspartner)	DspOp	35S- <i>bar</i>		Ac
			DspOp in place	empty	
ZR23.4 3	wt 1005	-	-	-	-
001R-1	<i>Ac</i> 9 x wt	+	+	-	-
001R-2	<i>Ac</i> 9 x wt	-	+	-	+
001R-3	<i>Ac</i> 9 x wt	-	+	-	-
001R-4	<i>Ac</i> 9 x wt	-	+	-	-
001R-5	<i>Ac</i> 9 x wt	+	-	+	+
001R-6	<i>Ac</i> 9 x wt	+	+	-	-
001R-7	<i>Ac</i> 9 x wt	+	+	-	-
001R-8	<i>Ac</i> 9 x wt	+	-	+	+
001R-9	<i>Ac</i> 9 x wt	+	+	-	-
001R-10	<i>Ac</i> 9 x wt	+	+	-	-
001R-11	<i>Ac</i> 9 x wt	-	+	+	+
001R-12(001R-1 <sup>R</sup> )	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
001R-13(001R-2 <sup>R</sup> )	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
001R-14(001R-3 <sup>R</sup> )	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	+
001R-15(001R-4 <sup>R</sup> )	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
001R-16(001R-5 <sup>R</sup> )	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
001R-17(001R-6 <sup>R</sup> )	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	+
001R-18(001R-7 <sup>R</sup> )	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
001R-19(001R-8 <sup>R</sup> )	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	+	+
001R-20(001R-9 <sup>R</sup> )	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	+	+
001R-21(001R-10 <sup>R</sup> )	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
001R-22(001R-11 <sup>R</sup> )	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	+
002R-01	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-02	<i>Ac</i> 9 x wt	+	-	+	+
002R-03	<i>Ac</i> 9 x wt	-	+	-	-
002R-04	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-05	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-06	<i>Ac</i> 9 x wt	+	~	+	+
002R-07	<i>Ac</i> 9 x wt	+	-	+	+
002R-08	<i>Ac</i> 9 x wt	+	-	-	-
002R-09	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-10	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	+	+
002R-11	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	+
002R-12	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-13	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	+
002R-14	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-15	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-16	<i>Ac</i> 9 x wt	+	-	+	-
002R-17	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	+
002R-18	<i>Ac</i> 9 x wt	+	+	+	+
002R-19	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-20	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-22	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	+	-
002R-23	<i>Ac</i> 9 x wt	+	-	+	-
002R-24	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-25	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	+	+
002R-26	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-27	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-28	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	+	+
002R-29	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-30	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	+	+
002R-31	<i>Ac</i> 9 x wt	+	-	+	+
002R-32	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-33	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-34	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	+
002R-35	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	+	+
002R-36	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	-	-
002R-37	<i>Ac</i> 9 x wt	-	-	+	+

(+:PCR-Fragment vorhanden; -:kein PCR-Fragment; ~:schwaches PCR-Fragment; leeres Feld: nicht untersucht; <sup>R</sup>:neu durchnummeriert, vergleiche Bachelorarbeit Ringleb 2008.)

### 7.3 Segregationsanalysen der ADW/ADL-Tabaklinien

Anteil resistenter Tabakpflanzen der ADL bzw. ADW-Linien auf Selektionsmedium mit Kanamycin (Kan), Phosphinothricin (Ppt), Hygromycin (Hyg) oder Methotrexat (Met); a und b bezieht sich auf zwei unabhängige Kreuzungen.)

Pflanzenlinie	Kan	Kan/Ppt	Met	Ppt	Hyg
ADL 1 a	50,0%		100,0%		
ADL 2 a	50,5%		0,0%		74,2%
ADL 2 b	52,9%		100,0%		
ADW 2 a	54,2%		0,0%		
ADL 3 a	0,0%		100,0%	54,4%	71,7%
ADL 3 b	46,7%		100,0%		
ADW 3 a	55,3%	18,2%	0,0%		
ADL 4 a	50,3%		100,0%		
ADL 5 a	48,9%		100,0%		
ADL 5 b	.	55,4%			
ADL 7 a	54,5%		100,0%		
ADL 8 a	52,1%		100,0%		
ADL 9 a	54,7%		100,0%		
ADL 9 b	.	51,8%			
ADL 10 a	52,2%		100,0%		
ADL 11 a	58,0%		100,0%		
ADL 12 a	53,6%		100,0%		
ADL 13 a	48,5%		100,0%		
ADL 13 b	51,2%		100,0%		
ADL 14 a	49,0%		100,0%		
ADL 15 a	47,8%		100,0%		
ADL 15 b	51,0%	44,7%	100,0%		
ADL 16 a	82,7%		100,0%		
ADL 16 b	72,9%		100,0%		
ADL 17 a	17,7%	22,5%	100,0%		
ADL 17 b	45,2%		100,0%		
ADL 18 a	47,7%		100,0%		
ADL 20 a	50,7%		100,0%		
ADL 21 a	41,6%		100,0%		
ADW 21 a	51,9%				
ADL 22 a	46,3%	27,2%	100,0%		
ADW 22 a	46,3%				
ADL 23 a	47,7%		100,0%		
ADW 23 a	46,7%				
ADL 24 a	50,9%		100,0%		
ADL 24 b	.	48,9%			
ADL 25 a	52,2%		100,0%		
ADL 26 a	52,2%		100,0%		
ADL 27 a	51,0%		100,0%		
ADL 28 a	50,6%		100,0%		
ADL 29 a	52,6%		100,0%		
ADL 29 b	.	49,8%			
ADW 29 a	56,4%				
ADL 30 a	53,2%		100,0%		
ADL 31 a	50,9%		100,0%		
ADL 32 a	46,8%		100,0%		
ADW 32 a	77,1%				
ADL 33 a	46,3%	27,8%	100,0%		
ADW 33 a	49,6%				
ADL 34 a	51,3%	50,9%	100,0%		
ADL 35 a	45,5%		100,0%		
ADL 35 b	.	52,1%			
ADL 36 a	45,9%		100,0%		
ADL 37 a	0,0%		100,0%	47,1%	77,8%
ADL 37 b	46,5%		100,0%		
ADW 37 a	40,3%		0,0%		
ADW 37 b	54,5%		0,0%		
ADL 38 a	45,5%		100,0%		
ADL 39 a	46,0%		0,0%		
ADL 39 b	57,7%		100,0%		
ADL 40 a	52,9%		100,0%		
ADL 40 b	50,8%		100,0%		
ADW 40 a	51,0%	23,5%	0,0%		

## 7 Anhang

<u>Pflanzenlinie</u>	Kan	Kan/Ppt	Met	Ppt	Hyg
ADL 42 a	51,7%		100,0%		
ADL 43 a	51,6%		100,0%		
ADL 44 a	55,1%		100,0%		
ADL 45 a	51,2%		100,0%		
ADL 45 b	.	51,0%			
ADL 46 a	44,7%		100,0%		
ADL 47 a	54,6%		100,0%		
ADL 48 a	46,2%		100,0%		
ADL 49 a	48,0%		100,0%		
ADW 49 a	51,4%		0,0%		
ADL 50 a	55,0%		100,0%		
ADL 51 a	53,8%		100,0%		
ADL 52 a	50,0%	50,8%	100,0%		
ADW 52 a	46,3%	21,6%	0,0%		
ADW 52 b	48,9%	22,9%	100,0%		
ADL 53 a	0,0%		100,0%	45,0%	79,6%
ADL 53 b	49,4%		100,0%		
ADW 53 a	0,0%		0,0%	49,5%	74,3%
ADW 53 b	50,0%		0,0%		
ADL 54 a	47,7%		100,0%		
ADL 55 a	51,9%		100,0%		
ADL 55 b	.	25,1%	100,0%		
ADL 56 a	54,1%		100,0%		
ADL 57 a	51,0%		100,0%		
ADL 58 a	46,4%		100,0%		
ADL 59 a	45,0%		100,0%		
ADL 60 a	47,9%		100,0%		
ADL 61 a	48,1%	53,8%	100,0%		
ADL 61 b	52,7%	51,3%	100,0%		
ADW 61 b	~50%	27,7%	0,0%		
ADL 62 a	48,4%		100,0%		
ADL 63 a	54,0%		100,0%		
ADL 64 a	51,9%		100,0%		
ADL 64 b	.	50,1%			
ADL 65 a	48,9%		100,0%		
ADL 66 a	52,8%		100,0%		
ADL 67 a	44,3%		100,0%		
ADL 68 a	49,5%		100,0%		
ADW 68 a	46,1%				
ADL 69 a	52,5%		100,0%		
ADW 69 a	52,3%				
ADL 70 a	52,8%		100,0%		
ADL 71 a	47,6%		100,0%		
ADL 71 b	.	49,7%			
ADW 71 a	47,1%				
ADL 72 a	46,8%		100,0%		
ADL 73 a	51,9%		100,0%		
ADL 74 a	51,6%		100,0%		
ADL 75 a	54,5%		100,0%		
ADL 76 a	46,3%		100,0%		
ADL 77 a	0,0%		100,0%		
ADL 79 a	51,4%		100,0%		
ADL 80 a	49,6%		100,0%		
ADL 80 b	.	48,1%			
ADW 80 a	50,9%				
ADL 81 a	50,8%		100,0%		
ADL 82 a	50,8%		100,0%		
ADL 83 a	47,1%		100,0%		
ADL 84 a	45,5%		100,0%		
ADL 85 a	53,0%		100,0%		
ADL 87 a	50,0%		100,0%		
ADL 90 a	51,1%		100,0%		
ADL 92 a	52,2%		100,0%		
ADL 94 a	53,3%		100,0%		
ADL 95 a	54,4%		100,0%		
ADL 97 a	52,8%	53,1%	100,0%		
ADL 98 a	48,9%		100,0%		
ADL 100 a	47,8%		100,0%		
ADW 100 a	51,2%		0,0%		
ADL 101 a	48,1%		100,0%		
ADL 101 b	.	27,5%			

## 7 Anhang

<u>Pflanzenlinie</u>	Kan	Kan/Ppt	Met	Ppt	Hyg
ADL 102 a	51,0%		100,0%		
ADL 102 b	.	48,1%			
ADL 103 a	55,1%		100,0%		
ADW 103 a	50,9%		0,0%		
ADL 104 a	54,7%		100,0%		
ADL 106 a	0,0%		100,0%	57,3%	76,4%
ADL 106 b	0,0%		100,0%	49,4%	73,3%
ADW 106 a	0,0%		0,0%	42,1%	75,8%
ADL 107 a	52,9%		100,0%		
ADL 108 a	49,3%		100,0%		
ADL 109 a	56,8%		100,0%		
ADL 110 a	54,9%		100,0%		
ADL 111 a	43,2%		100,0%		
ADL 112 a	50,0%		100,0%		
ADL 112 b	~50%		100,0%		
ADW 112 a	~50%		0,0%		
ADW 112 b	~50%		0,0%		
ADL 113 a	47,4%	24,7%	100,0%		
ADL 113 b	~50%	53,0%	100,0%		
ADW 113 a	~50%	23,5%	0,0%		
ADW 113 b	51,6%	52,0%	0,0%		
ADL 114 a	55,4%		100,0%		
ADL 115 a	55,1%		100,0%		
ADL 116 a	56,3%		100,0%		
ADL 117 a	47,4%		100,0%		
ADL 118 a	~50%		100,0%		
ADL 119 a	50,0%		100,0%		
ADW 119 a	53,4%				
ADL 120 a	49,3%		100,0%		

## 7.4 GUS-Werte

GUS-Werte in  $\text{pmol}(4\text{MU})/(\text{min}\cdot\text{mg})$  der Tabaklinien zum Test der IPTG-Regulierbarkeit des Transkriptionsaktivators LhG4

Tabak- linie		DspOp-GUS (ohne LhG4)	DspOp- GUS +LhG4	DspOp-GUS+LhG4 (10mM IPTG)	DspOp-GUS+LhG4 (1mM IPTG)	DspOp-GUS+LhG4 (0,1mM IPTG)
G0:3-20	Einzelpflanze1	8,04	29815,13	446,92	902,50	9223,37
	Einzelpflanze2	6,85	27022,42	401,51	1909,95	10870,07
	Einzelpflanze3	7,84	58384,09	188,56	1396,17	6436,03
	Mittelwert	7,58	38407,22	424,21	1402,87	8843,16
	Standardabweichung	0,63	17356,74	137,94	503,76	2241,34
G2:3-7	Einzelpflanze1	16,55	30359,77	648,54	959,21	4767,93
	Einzelpflanze2	24,11	29522,24	955,57	894,22	5620,37
	Einzelpflanze3	30,04	32173,09	1014,22	1013,23	2832,71
	Mittelwert	23,57	30685,04	872,78	955,56	4407,00
	Standardabweichung	6,76	1355,02	196,40	59,59	1428,44
G3:3-8	Einzelpflanze1	14,88	1466,46	27,53	40,95	361,51
	Einzelpflanze2	4,91	1718,70	76,56	80,66	190,37
	Einzelpflanze3	4,80	1796,45	34,75	70,16	280,33
	Mittelwert	8,20	1660,53	46,28	63,92	277,40
	Standardabweichung	5,79	172,51	26,47	20,58	85,61
G4: 3-9	Einzelpflanze1	3,12	2288,14	16,66	32,84	72,49
	Einzelpflanze2	5,63	1987,26	20,45	70,02	226,74
	Einzelpflanze3	1,61	1992,38	11,95	81,84	128,05
	Mittelwert	3,45	2089,26	16,35	61,57	142,43
	Standardabweichung	2,03	172,26	4,26	25,57	78,12
G5:3-12	Einzelpflanze1	1,32	324,89	5,93	16,55	59,39
	Einzelpflanze2	1,12	216,39	5,83	10,35	86,73
	Einzelpflanze3	1,16	290,98	4,84	23,30	76,27
	Mittelwert	1,20	277,42	5,53	16,73	74,13
	Standardabweichung	0,11	55,51	0,60	6,47	13,79
G6:3-16	Einzelpflanze1	31,06	23871,31	85,26	115,34	633,78
	Einzelpflanze2	44,47	27054,32	86,63	92,85	788,75
	Einzelpflanze3	51,79	23716,13	78,21	71,33	766,17
	Mittelwert	42,44	24880,58	83,37	93,17	729,57
	Standardabweichung	10,51	1884,11	4,52	22,00	83,72
G7:3-18	Einzelpflanze1	3,89	1806,46	2,68	3,25	66,76
	Einzelpflanze2	3,07	1838,05	4,80	4,16	58,19
	Einzelpflanze3	3,54	1944,73	10,47	75,43	117,31
	Mittelwert	3,50	1863,08	5,98	27,61	80,75
	Standardabweichung	0,41	72,45	4,03	41,41	31,95

### 7.5 Segregationsanalysen der *A. thaliana* Linien mit *Ac* und *ihp*-Elementen

Segregation der *Arabidopsis thaliana* Linien zur Ermittlung der Anzahl der T-DNA-Loci und der Zygotie. Braun: Saatgut der Generation; grün: Pflanze aus der das Saatgut stammt; ↓: Aussaat auf MS-Medium mit Methotrexat (Met) mit Angabe der resistenten Pflanzen; —|: nicht weiter vermehrt/untersucht; ☒: Pflanze, die für die RT-PCR verwendet wurde.

Linie	Transformante (Konstrukt)	Samen für F1/ F1-Pflanze	Samen für F2/ F2-Pflanze	Samen für F3/ F3-Pflanze	Pflanzen für die RT-PCR	Bemerkung
A1	A <sub>acg</sub>	A1X				1T-DNA-Lokus
		↓ 77,1% Met				
		A1-1	A1-1X			heterozygot
		↓ 76,4% Met				
		A1-2	A1-2X		☒	heterozygot
		↓ 74% Met				
A5	A <sub>acg</sub>	A5X				1T-DNA-Lokus
		↓ 73% Met				
		A5-1	A5-1X			homozygot
		↓ 100% Met			☒	
		A5-2—				
		A5-3	A5-3X			homozygot
A17	A <sub>acg</sub>	A17X				2T-DNA-Loci
		↓ 88,2% Met				
		A17-1	A17-1X		☒	heterozygot
		↓ 89,9% Met				
		A17-2—				
		A17-3—				
A9	A <sub>acg-R</sub>	A9X				1 T-DNA Lokus
		↓ 73,2% Met				
		A9-1	A9-1X			heterozygot
		↓ 70,2% Met				
		A9-2	A9-2X			heterozygot
		↓ 78,3% Met				
		A9-3	A9-3X		☒	heterozygot
		↓ 73,2% Met				
		A9-4	A9-4X			heterozygot
		↓ 84,9% Met				
		A9-5	A9-5X			heterozygot
		↓ 74,1% Met				
		A9-6	A9-6X			heterozygot
		↓ 68,3% Met				

## 7 Anhang

Linie	Transformante (Konstrukt)	Samen für F1/ F1-Pflanze	Samen für F2/ F2-Pflanze	Samen für F3/ F3-Pflanze	Pflanzen für die RT-PCR	Bemerkung
A11	Acg-R	A11X				2T-DNA-Loci
		↓ 89,8% Met				
		A11-1				
		A11-2				
		A11-3	A11-3X			heterozygot
		↓ 78,9% Met				
		A11-4	A11-4X			homozygot
		↓ 100% Met				
		A11-4-1	A11-4-1X			homozygot
		A11-4-2	A11-4-2X			homozygot
		A11-4-3	A11-4-3X			homozygot
A12	Acg-R	A12X				1T-DNA-Lokus
		↓ 70,3% Met				
		A12-1				
		A12-2				
		A12-3	A12-3X			homozygot
		↓ 100% Met				
		A12-3-1	A12-3-1X			homozygot
		A12-3-2	A12-3-2X			homozygot
		A12-3-3	A12-3-3X			homozygot
		A12-4	A12-4X			homozygot
		↓ 100% Met				
		A12-4-1	A12-4-1X			homozygot
		A12-4-2	A12-4-2X			homozygot
		A12-4-3	A12-4-3X			homozygot
A15	Acg-R	A15X				1T-DNA-Lokus
		↓ 75,9% Met				
		A15-1				
		A15-2	A15-2X			heterozygot
		↓ 68,5% Met				
		A15-3				
		A15-4	A15-4X			heterozygot
		↓ 79,5% Met				
i1	Acg-ihp200	i1X				1 T-DNA Lokus
		↓ 62,7% Met				
		i1-1	i1-1X			(homozygot)
		↓ 96,4% Met				
		i1-1-1	i1-1-1X			homozygot
		i1-1-2	i1-1-2X			homozygot
			↓ 100% Met			
		i1-1-3	i1-1-3X			homozygot
		i1-2	i1-2X			heterozygot
		↓ 68,8% Met				
		i1-3				
		i1-4				

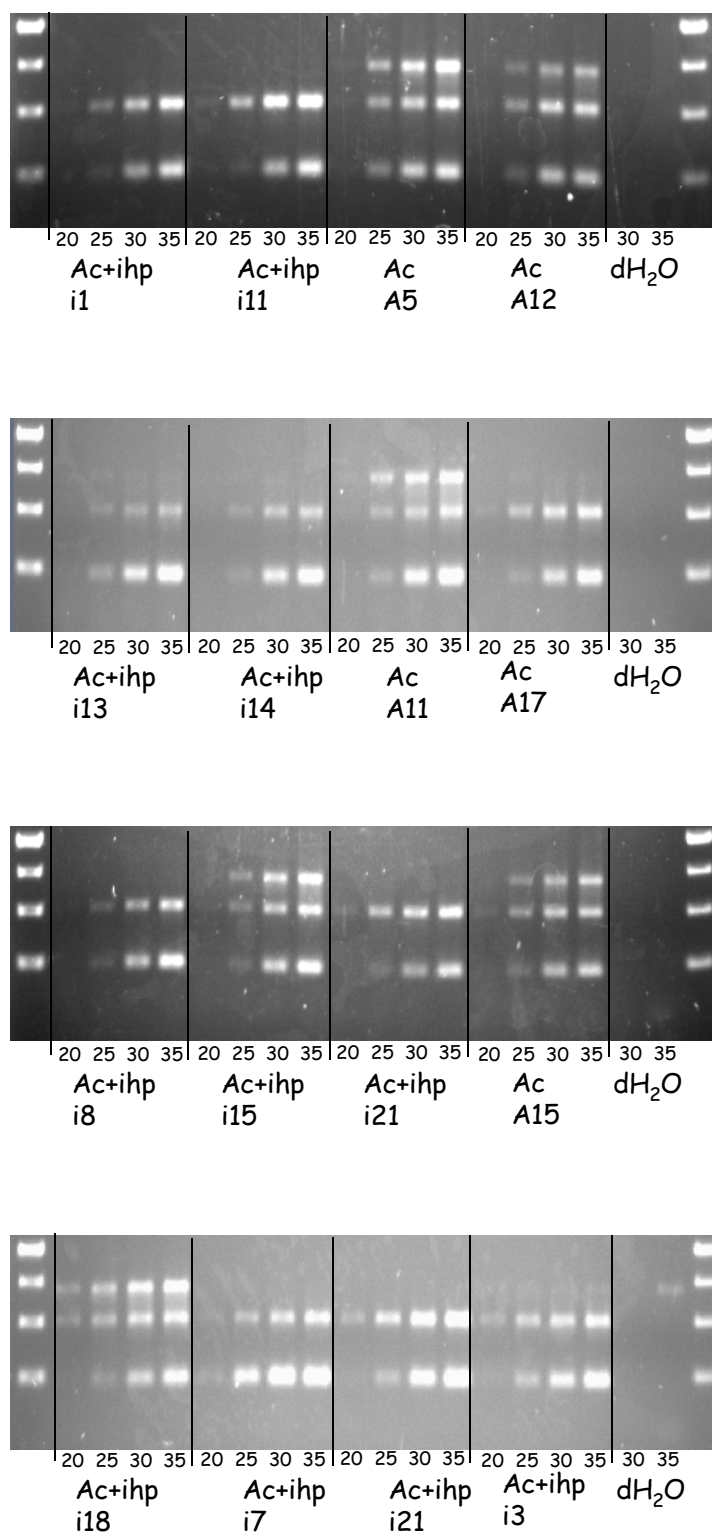
## 7 Anhang

Linie	Transformante (Konstrukt)	Samen für F1/ F1-Pflanze	Samen für F2/ F2-Pflanze	Samen für F3/ F3-Pflanze	Pflanzen für die RT-PCR	Bemerkung
i3	Acg-ihp200	i3X				1 T-DNA Locus
		↓ 72,2% Met				
		i3-1	i3-1X			heterozygot
			↓ 70,8% Met			
		i3-2	i3-2X			heterozygot
			↓ 75,7% Met			
		i3-3	i3-3X			homozygot
			↓ 100% Met			
			i3-3-1	i3-3-1X		homozygot
i13	Acg-ihp200		i3-3-2	i3-3-2X		homozygot
		i3-4				
		i13X				1 T-DNA Locus
		↓ 77,1% Met				
		i13-1	i13-1X			homozygot
			↓ 100% Met			
		i13-2				
		i13-3				
		i13-4				
i14	Acg-ihp200	i13-5	i13-5X			heterozygot
			↓ 64,9% Met			
		i14X				1 T-DNA Locus
		↓ 73,6% Met				
		i14-1	i14-1X			heterozygot
			↓ 75,9% Met			
		i14-2				
		i14-3	i14-3X			homozygot
			↓ 100% Met			
i7	Acg-R-ihp200		i14-3-1	i14-3-1X		homozygot
			i14-3-2	i14-3-2X		homozygot
			i14-3-3	i14-3-3X		homozygot
		i14-4				
		i7X				1 T-DNA Locus
		↓ 74,7% Met				
		i7-1	i7-1X			heterozygot
			↓ 76,6% Met			
		i7-2				
i7	Acg-R-ihp200	i7-3				
		i7-4				
		i7-5	i7-5			heterozygot
			↓ 74,3% Met			



Linie	Transformante (Konstrukt)	Samen für F1/ F1-Pflanze	Samen für F2/ F2-Pflanze	Samen für F3/ F3-Pflanze	Pflanzen für die RT-PCR	Bemerkung
i8	Acg-R-ihp200	i8X				1 T-DNA Locus
		↓ 71,8% Met				
		i8-1	i8-1X			heterozygot
			↓ 79% Met			
		i8-1-1	i8-1-1X			heterozygot
			↓ 76,4% Met			
		i8-1-2	i8-1-2X			heterozygot
			↓ 81% Met			
		i8-1-3	i8-1-3X			wenig Samen
			↓ 100% Met			
		i8-1-4	i8-1-4X			heterozygot
			↓ 79,6% Met			
			i8-2			
	i8-3					
	i8-4					
i11	Acg-R-ihp200	i11X				1 T-DNA Locus
		↓ 79% Met				
		i11-1	i11-1X			heterozygot
			↓ 77,1% Met			
		i11-2	i11-2X			homozygot
			↓ 100% Met			
		i11-2-1	i11-2-1X			homozygot
			↓ 100% Met			
	i11-2-2	i11-2-2X			homozygot	
	i11-2-3	i11-2-3X			homozygot	
	i11-3					
	i11-4					
i20	Acg-R-ihp400	i20X				
	↓ 88,7% Met				2 T-DNA-Loci	
i21	Acg-R-ihp400	i21X				
	↓ 92,7% Met				2 T-DNA Loci	
i18	Acst-ihp200	i18X				2 T-DNA Loci
		↓ 89,3% Met				
		i18-1				
		i18-2	i18-2X			heterozygot
			↓ 75,2% Met			
		i18-3				
	i18-4	i18-4X			heterozygot	
	↓ 81,9% Met					
i15	Acst-ihp400	i15X				1 T-DNA Locus
		↓ 81,1% Met				
		i15-1				
		i15-2	i15-2X			homozygot
			↓ 100% Met			
		i15-3				
		i15-4				
	i15-5					
	i15-6	i15-6X			heterozygot	
	↓ 81,7% Met					

## 7.6 Gelfotos der Multiplex-RT-PCR zum Ac-Transkriptnachweis



## 7.7 DNA-, Glycerinkultur- und Samenverzeichnis

Bezeichnung	DNA-Nr.	Glycerin-Nr. ( <i>E. coli</i> )	Glycerin-Nr. ( <i>A. tumefaciens</i> )	Verweis
Plasmidvektoren allgemein				
p70SRUC	2815	2125		Tabelle 2.2
pART27	3963		2568	Tabelle 2.2
pCR2.1	3962	2766		Tabelle 2.2
pGUS3	4164	3003		Tabelle 2.2
pHannibal	4341	2880		Tabelle 2.2
pLH5000	4415	2898	2951	Tabelle 2.2
pOCA28	1987	2096	3069	Tabelle 2.2
pVKH-35S-pA	3578	1086	2566	Tabelle 2.2
pVKHDsOpGUS1	2100	1111	1147	Tabelle 2.2
pVKIGAL4	2929		2316	Tabelle 2.2
Plasmide der Zuckerrüben Transformationen				
Ac1569 =(UW1569)	2709			Abschnitt 2.9.1
Ac1596 =(UW1596)	2710			Abschnitt 2.9.1
pOCA28bar::Ac9	2826	2151	2154	Abschnitt 2.9.2
pOCA28bar::DsHyg1	2723	2116	2155	Abschnitt 2.9.2
pOCA28bar::DsHyg2	2724	2117	2156	Abschnitt 2.9.2
pVKHBastaDspOp1	2098	1105	1137	Abschnitt 2.9.1
pVKHBastaDspOp2	2099	1106	1142	Abschnitt 2.9.1
Neue Konstrukte (Markergeneliminierung)				
Acg	4523	2985	3010	Abschnitt 2.9.3
Acg-ihp200	4525	2989	3011	Abschnitt 2.9.3
Acg-ihp400	4524	2986	3009	Abschnitt 2.9.3
Acg-R	4529	2993	3013	Abschnitt 2.9.3
Acg-R-ihp200	4530	2994	3014	Abschnitt 2.9.3
Acg-R-ihp400	4532	2996	3007	Abschnitt 2.9.3
Acst-ihp200	4454	2961	2969	Abschnitt 2.9.4
Acst-ihp400	4450	2957	2972	Abschnitt 2.9.4
pADi2-a	4585	3057		Abschnitt 2.9.4
pADi2-b	4586	3058		Abschnitt 2.9.4
pADi2R-a	4753	3132		Abschnitt 2.9.4
pADi2R-b	4754	3133		Abschnitt 2.9.4
pADi4	4584	3056		Abschnitt 2.9.4
pADi4R	4752	3131		Abschnitt 2.9.4
pHanni-ihp200	4360	2882		Abschnitt 2.9.4
pHanni-ihp400	4359	2881		Abschnitt 2.9.4
pLH5000-Acst	4440	2939	2953	Abschnitt 2.9.4

Bezeichnung	DNA-Nr.	Verweis
Oligonukleotide		
1099(U21)	3821	Abschnitt 2.7
469(L20)	3819	Abschnitt 2.7
568(L30)	3823	Abschnitt 2.7
Ac1685(XbaI)	4345	Abschnitt 2.7
Ac1685(XhoI)	4343	Abschnitt 2.7
Ac1710	4731	Abschnitt 2.7
Ac1742(XbaI)	4359	Abschnitt 2.7
Ac1742(XhoI)	4347	Abschnitt 2.7
Ac1954<(EcoRI)	4348	Abschnitt 2.7
Ac1954<(HindIII)	4350	Abschnitt 2.7
Ac2085<(EcoRI)	4344	Abschnitt 2.7
Ac2085<(HindIII)	4346	Abschnitt 2.7
Ac2419	4732	Abschnitt 2.7
Ac8	3671	Abschnitt 2.7
Ac9	3672	Abschnitt 2.7
Acc(1345/1800)	3421	Abschnitt 2.7
Acst-91<	4869	Abschnitt 2.7
bar1343	4870	Abschnitt 2.7
bar1777<	4871	Abschnitt 2.7
dhfr522<	4730	Abschnitt 2.7
dhfr8	4729	Abschnitt 2.7
Ds(-112/25)	4874	Abschnitt 2.7
Ds1	2642	Abschnitt 2.7
Ds1153<	4873	Abschnitt 2.7
Ds751	4872	Abschnitt 2.7
gapC_L	3532	Abschnitt 2.7
gapC_R	3533	Abschnitt 2.7
gus_L	4808	Abschnitt 2.7
gus_R	4809	Abschnitt 2.7
I(Ds1)-108	4687	Abschnitt 2.7
I(Ds1)-137	4686	Abschnitt 2.7
I(Ds2)212<	4684	Abschnitt 2.7
I(Ds2)94<	4685	Abschnitt 2.7
I6-8_L2	4583	Abschnitt 2.7
I6-8_U2	4582	Abschnitt 2.7
Int155	4696	Abschnitt 2.7
Int164<	4868	Abschnitt 2.7
Int583<	4697	Abschnitt 2.7
Int670	4867	Abschnitt 2.7
M13revers	4733	Abschnitt 2.7
Ocs44<	4866	Abschnitt 2.7
Primer 5 (35SCaMV)	2646	Abschnitt 2.7
Primer 6 (bar)	2647	Abschnitt 2.7
RB19<	4865	Abschnitt 2.7
T7	3265	Abschnitt 2.7

Bezeichnung	Samen-Nr.	Verweis
<i>Beta vulgaris</i>		
001R	4102	Tabelle 2.5
002D	4097	Tabelle 2.5
002R	4103	Tabelle 2.5
1102D	4093	Tabelle 2.5
1103D	4094	Tabelle 2.5
1107D	4086	Tabelle 2.5
1108D	4087	Tabelle 2.5
1109D	4090	Tabelle 2.5
1110D	4091	Tabelle 2.5
3W	4109	Tabelle 2.5
5W	4108	Tabelle 2.5
<i>Nicotiana tabacum</i>		
AD3	4502	Abschnitt 2.10.4
AD22	4521	Abschnitt 2.10.4
AD23-I	4522	Abschnitt 2.10.4
AD23-II	4523	Abschnitt 2.10.4
ADL1a bis ADL100a	4606 bis 4705	Abschnitt 2.10.4
ADL101a bis ADL120a	5206 bis 5225	Abschnitt 2.10.4
ADL1b bis ADL100b	4706 bis 4805	Abschnitt 2.10.4
ADL101b bis ADL120b	5226 bis 5245	Abschnitt 2.10.4
ADW1a bis ADW100a	4806 bis 4905	Abschnitt 2.10.4
ADW101a bis ADW120a	5246 bis 5265	Abschnitt 2.10.4
ADW1b bis ADW100b	4906 bis 5005	Abschnitt 2.10.4
ADW101b bis ADW120b	5266 bis 5285	Abschnitt 2.10.4
<i>Arabidopsis thaliana</i>		
(Die Samen entstanden durch Selbstung der untersuchten Pflanzen)		
A1 (=A1-2X)	4402	Tabelle 3.2
A5 (=A5-1X)	4406	Tabelle 3.2
A9 (=A9-3X)	4411	Tabelle 3.2
A11 (=A11-4X)	4417	Tabelle 3.2
A12 (=A12-3X)	4422	Tabelle 3.2
A15 (=A15-2X)	4431	Tabelle 3.2
A17 (=A17-1X)	4434	Tabelle 3.2
i1 (=i1-1-2X)	4440	Tabelle 3.2
i3 (=i3-3X)	4446	Tabelle 3.2
i7 (=i7-1X)	4450	Tabelle 3.2
i8 (=i8-1-4X)	4457	Tabelle 3.2
i11 (=i11-2-1X)	4461	Tabelle 3.2
i13 (=i13-5X)	4466	Tabelle 3.2
i14 (=i14-3-2X)	4470	Tabelle 3.2
i15 (=i15-2X)	4474	Tabelle 3.2
i18 (=i18X)	4476	Tabelle 3.2
i20 (=i20X)	4479	Tabelle 3.2
i21 (=i21X)	4480	Tabelle 3.2

### Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Mentor, Herrn Prof. Dr. Reinhard Hehl, für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, sowie die konstruktiven Vorschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Auch bedanke ich mich für das in mich gesetzte Vertrauen und für die Möglichkeit auch in zukünftigen Projekten weiterzuarbeiten.

Herrn Prof. Dr. Ralf Rainer Mendel danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und für die Übernahme des Koreferats. Außerdem bedanke ich mich für die Möglichkeit die Einrichtungen seines Instituts zu nutzen.

Beim BMBF bedanke ich mich für die Finanzierung des Projektes zur Markergeneliminierung im Rahmen der Forschung zur Biologischen Sicherheit.

Ein Dank an die KWS Saat AG und die Planta GmbH für die Herstellung des Zuckerrüben Saatguts. Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Josef Kraus und den freundlichen Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe, die mich in die hairy root Transformation eingeführt haben.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Kristin Schnettler, Corinna Streitner, Fabian Machens und Malte Ringleb, die mit ihren experimentellen Ergebnissen im Rahmen von Studien-/Bachelorarbeiten einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik danke ich für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danke ich Frau Elke Faurie für die Aufrechterhaltung eines netten Arbeitsklimas, die gute Organisation und Pflege der Laborräume, die Geduld bei der Einführung in zahlreiche molekularbiologische Techniken und die Unterstützung bei diversen Experimenten. Jeannette Kappler danke ich für die stetige Motivierung und Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin bedanke ich mich bei Alexander Rotthues für die enge und langjährige Freundschaft und die Ratschläge bei fachlichen und persönlichen Problemen.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine kleine Familie, die sehr viel Freude in mein Leben bringt und es mir nicht verübelt hat, wenn ich sie während der Erstellung der Arbeit gelegentlich vernachlässigt habe.

Ein letzter und besonders großer Dank geht an meine Eltern, Evi und Arno, für die Unterstützung in allen Lebensbereichen und die großzügige finanzielle Hilfe während meines gesamten Bildungsweges. Danke!

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Ralph Lisson  
Geburtsdatum: 21. Mai 1972  
Geburtsort: Lübeck  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

### Schulausbildung

1978-1982 Grundschule Bortfeld  
1982-1984 Orientierungsstufe Wendeburg  
1984-1988 Realschule Vechelde  
1988-1989 Savanna High School (Anaheim, CA; USA)  
Abschluss: High School Diploma  
1989-1992 Ostseegymnasium Timmendorfer Strand  
  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Wehrdienst

1992-1993 Fernmeldedienst (Versorger „Meersburg“, 1.UG)

### Berufsausbildung

1993-1996 Energieelektroniker Villeroy&Boch  
  
Abschluss: Energieelektroniker-Betriebstechnik

### Studium

1996-2002 Diplomstudiengang Biotechnologie  
Technische Universität Braunschweig  
  
Diplomarbeit am Institut für Genetik  
„Untersuchungen zur Transposition der Mais *Ac/Ds*-Elemente  
in der Zuckerrübe“ (2002)  
  
Abschluss: Diplom-Biotechnologe

### Beschäftigung

seit 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Institut für Genetik (AG Prof. Dr. Hehl)  
Technische Universität Braunschweig